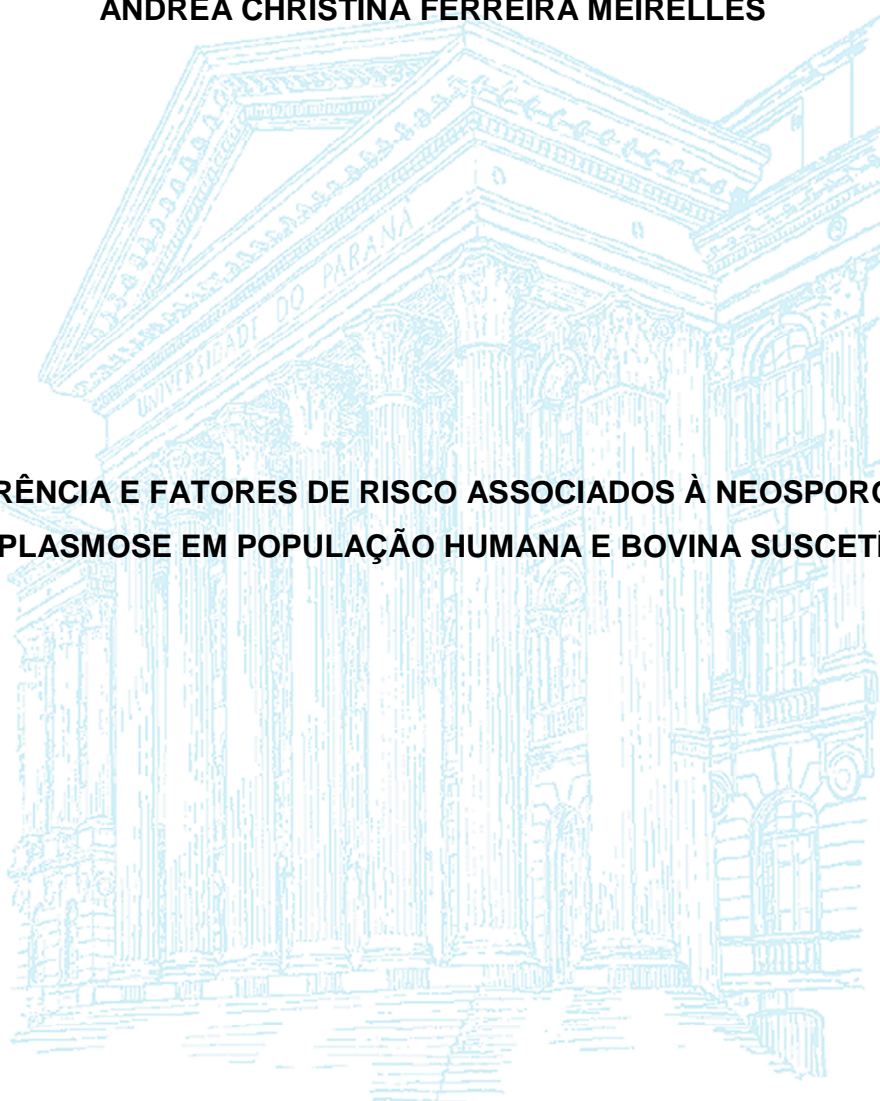


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANDRÉA CHRISTINA FERREIRA MEIRELLES

**OCORRÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À NEOSPOROSE E
TOXOPLASMOSE EM POPULAÇÃO HUMANA E BOVINA SUSCETÍVEIS**



CURITIBA
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**OCORRÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À NEOSPOROSE E
TOXOPLASMOSE EM POPULAÇÃO HUMANA E BOVINA SUSCETÍVEIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Professora Dra. Rosangela Locatelli-Dittrich

CURITIBA
2014

M514 Meirelles, Andréa Christina Ferreira
Ocorrência e fatores de risco associados à neosporose e toxoplasmose em população humana e bovina suscetíveis. / Andréa Christina Ferreira Meirelles. – Curitiba : 2014
104 f. il.

Orientadora: Rosangela Locatelli Dittrich.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

1. Parasitologia veterinária. 2. Bovino de leite – Doenças - Paraná. 3. Trabalhadores rurais. I. Dittrich, Rosangela Locatelli. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título

CDU 619.699(816.2)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Tese intitulada "**OCORRÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À NEOSPOROSE E TOXOPLASMOSE EM POPULAÇÃO HUMANA E BOVINA SUSCETÍVEIS**" apresentada pela Doutoranda **ANDRÉA CHRISTINA FERREIRA MEIRELLES** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Doutor em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 25 de abril de 2014

Professora Dra. Rosângela Locatelli Dittrich
Presidente/Orientadora

Professora Dra. Vanessa Yuri de Lima
Membro

Professora Dra. Simone Tostes de Oliveira Stedile
Membro

Professor Dr. Renato Andreotti e Silva
Membro

Professor Dr. Ivan Roque de Barros Filho
Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me iluminar e abençoar durante todo caminho percorrido.

Aos meus pais, Adelina e Reginaldo (*in memoriam*) por todo amor, carinho e atenção e por toda confiança que sempre depositaram em mim. Mesmo a um oceano de distância conseguiram me dar todo apoio e força que precisei para seguir esta trajetória e concretizar o meu sonho.

A toda minha família que sempre torceram e acompanharam minha jornada, em especial minha irmã Simone, por todo carinho, apoio e confiança que tem em mim e por sempre ter me acolhido em sua casa nas inúmeras viagens, por vezes semanais, de muitos e muitos quilômetros terrestres (539 km para ser mais exata) de Toledo a Curitiba. Agradeço também ao meu irmão, tios, primos, cunhados e sobrinhos. A família sempre foi muito importante em minha formação e sempre será minha base e estrutura – instituição Divina.

Muito obrigada à minha orientadora, professora Dra. Rosangela Locatelli-Dittrich, uma bonita combinação de rigor acadêmico e compreensão amiga. Agradeço imensamente a oportunidade, paciência, experiência, por todos os sábios ensinamentos, orientação, companheirismo, amizade e carinho com que fui recebida.

A todos os mestres que participaram da minha formação, o meu muito obrigado pela competência e por toda a dedicação e conhecimentos recebidos.

Aos meus colegas e amigos de trabalho da PUCPR *campus* Toledo, que me ajudaram a conciliar os horários de forma a poder ter tempo para a realização da minha tese.

O meu mais profundo agradecimento ao Diretor do Curso de Medicina Veterinária da PUCPR *campus* Toledo e amigo, Prof. Dr. Renato Herdina Erdmann, pelo apoio, estímulo e exemplo de retidão e dedicação a tudo que se compromete fazer.

Agradeço aos residentes Bruno, Carlos, Hagi e Tieme, mestrados Marília e Taís, ao técnico de laboratório Olair Beltrame e estagiários do Laboratório de Patologia

Clínica da UFPR, pela amizade e por toda a paciência, ajuda e dedicação que tiveram comigo. Em especial ao Bruno de Queiroz Castilhos e à Marília de Oliveira Koch, que eram residentes do laboratório na época e me ajudaram bastante quando comecei com as RIFIs. A ajuda da Marília com o PCR foi fundamental. Obrigada pela companhia, amizade, apoio e muitas, mas muitas risadas diárias!

Agradeço aos docentes da UFPR pela receptividade, “abertura das portas”, pelos comentários, e pelas orientações dadas.

Agradeço à agência de fomento CNPq pelo apoio financeiro para execução do projeto.

A todos os meus amigos e amigas que me apoiaram e incentivaram essa etapa da minha vida.

Aos alunos da graduação pelo estímulo constante pela busca do saber. Apraz-me poder dividir conhecimentos e experiências acumuladas com o tempo.

A todos aqueles que de alguma maneira tiveram participação na realização deste trabalho.

Dedico meus agradecimentos finais, não menos importantes, à minha amada filha Ana Clara Meirelles Rossi. Muito obrigado pela compreensão durante esses anos. Eu não seria feliz como sou sem você!

*"Se enxerguei mais longe,
foi porque estava sobre os ombros de gigantes."
Isaac Newton*

RESUMO GERAL

Há relatos de pessoas soropositivas para *N. caninum*, entretanto, os dados epidemiológicos são escassos, particularmente em trabalhadores rurais em contato direto com animais soropositivos. A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial e pode manifestar-se como infecção ou doença nas diversas espécies animais de sangue quente, incluindo o homem. Embora os bovinos sejam considerados resistentes à toxoplasmose, os dados disponíveis atualmente são discrepantes. Considerando a importância desses dois parasitas e a escassez de informações no Paraná, objetivou-se no presente estudo verificar a concordância do diagnóstico de *N. caninum* e *T. gondii* no soro e leite de bovinos leiteiros; investigar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação de polimerase em cadeia (PCR convencional e PCR em tempo real), em trabalhadores rurais e indivíduos imunodeprimidos portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), do Estado do Paraná; avaliação dos fatores de risco associados à infecção por *T. gondii* em trabalhadores rurais do estado do Paraná. O presente estudo está dividido em quatro capítulos. O capítulo I aborda a revisão bibliográfica geral sobre o *N. caninum* e o *T. gondii*; os capítulos II a IV estão escritos na forma de artigos científicos e descrevem os resultados obtidos no presente estudo. O Capítulo II aborda a Concordância na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* no sangue e no leite bovino pela Reação de Imunofluorescência Indireta. Para a toxoplasmose, o teste de RIFI em amostras de leite não é indicado, porém é viável para o diagnóstico da neosporose bovina. No Capítulo III estão descritos o sorodiagnóstico e a investigação molecular de *N. caninum* e *T. gondii* em seres humanos. Os anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados em indivíduos soropositivos para HIV com título de anticorpos séricos de 50 em 31,2% das amostras; não foram detectados anticorpos contra *N. caninum* nas amostras de soro de trabalhadores rurais; não foram identificados resultados positivos por PCR para o *N. caninum*; foram detectados anticorpos anti-*T. gondii*, pela RIFI, em 68,7% dos indivíduos soropositivos para HIV e em 40,7% dos trabalhadores rurais; não foram identificados resultados positivos pela PCR convencional e PCR *real time* para o *T. gondii*. No Capítulo IV está descrito o estudo dos Fatores de risco associados à infecção pelo *Toxoplasma gondii* em trabalhadores rurais pertencentes a propriedades leiteiras da microrregião de Toledo, oeste do Paraná. Neste estudo foram encontrados altos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* em 4,4% (1024) nos indivíduos amostrados; houve associação estatística significativa para o consumo de leite cru bovino e realizar atividades ligadas ao solo; a associação dos riscos relacionados à detecção de anticorpos anti-*T. gondii* como sexo, contato com bovinos soropositivos, consumo de carne crua ou mal cozida, consumo de hortaliças cruas, contato direto com felinos, consumo de embutidos e consumo de água de poço, não influenciaram na distribuição dos sororreagentes.

PALAVRAS-CHAVE: *Neospora caninum*; *Toxoplasma gondii*; HIV; Imunodeprimidos; trabalhadores rurais; vacas leiteiras.

ABSTRACT

Reports show existing cases of *N. caninum* seropositive people. However, epidemiologic data is scarce, particularly for farm workers in direct contact with seropositive animals. Toxoplasmosis is a worldwide zoonotic disease and it can emerge as infections or sickness in all warm-blooded animals, man included. Although cattle are considered resistant to toxoplasmosis, currently existing data are discordant. Taking into account the importance of both parasites and the shortage of information in Parana, we aimed at verifying the diagnosis concordance between *N. caninum* and *T. gondii* in cattle blood serum and milk; the presence of anti-*N. caninum* and anti-*T. gondii* antibodies through indirect immunofluorescence test and polymerase chain reactions (conventional and real-time PCR) in farm workers and in immunocompromised individuals who carry the human immunodeficiency virus (HIV), in the state of Parana; and the evaluation of risk factors associated to *T. gondii* infections in farms workers at the state of Parana. This paper is divided in four chapters. Chapter I approaches General bibliographical review on *N. caninum* and *T. gondii*; chapters II-IV were written as scientific articles, describing the results obtained in our study. Chapter II evaluates the Concordance between the detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in serum and milk of cattle by indirect fluorescent antibody test (IFAT). As for toxoplasmosis, IFAT testing in milk samples is not indicated, but it is feasible for diagnosing cattle neosporosis. Chapter III describes Serodiagnosis and molecular investigation of *N. caninum* and *T. gondii* in human beings. Anti-*N. caninum* antibodies were detected in HIV-seropositive individuals, whose serum antibody titers ranged 50 in 31.2% of samples. Anti- *N. caninum* antibodies were not found in serum samples from farm workers; and there were no positive results for *N. caninum* PCR. Anti-*T. gondii* antibodies were detected through IFAT in 68.7% of HIV-seropositive individuals and in 40.7% of farm workers. No positive results for conventional and real-time PCR were identified when it came to *T. gondii*. Chapter IV reports the research on Risk factors associated to toxoplasmosis in farm workers, all of which are inhabitants of Toledo and its outskirts, in western Parana. Such research found high anti-*T. gondii* antibody titers that reached 4.4% (1024) in sampled individuals. There was significant statistical association as for raw cow milk and carrying soil-related tasks. Risk associations related to detecting anti-*T. gondii* antibodies – like gender, contact with seropositive animals, raw or rare meat consumption, vegetable consumption, direct contact with felines, sausage and water consumption – did not influence the distribution of serodiagnostic reagents.

Keywords: *Neospora caninum*; *Toxoplasma gondii*; HIV; immunocompromised; farm workers; dairy cattle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I.....	20
FIGURA 1 – Ciclo biológico do <i>N. caninum</i> com seus hospedeiros.....	21
FIGURA 2 - Ciclo biológico do <i>T. gondii</i> com seus hospedeiros.....	28
CAPÍTULO III.....	53
FIGURA 1 – A. RIFI soropositiva para <i>N. caninum</i> (1:50); B. RIFI soropositiva para <i>T. gondii</i> (1:16), taquizoítas observados em lâmina de imunofluorescência indireta, aumento de 400x.....	59
FIGURA 2 - Eletroforese em gel de agarose a 1,4% de produtos de amplificação por PCR de <i>N. caninum</i> (A) e <i>T. gondii</i> (B) em amostras de sangue.....	62

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II.....	41
TABELA 1- Comparação entre o título de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> em amostras de soro sanguíneo e a detecção qualitativa de anticorpos em amostras de leite coletadas simultaneamente das mesmas vacas e avaliadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	46
TABELA 2- Comparação entre o título de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> em amostras de soro sanguíneo e a detecção qualitativa de anticorpos em amostras de leite coletadas simultaneamente das mesmas vacas e avaliadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	46
CAPÍTULO III.....	53
TABELA 1 - Características dos iniciadores utilizados na PCR convencional para pesquisa de <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i> e <i>PCR real time</i> para <i>T. gondii</i>	61
TABELA 2 – Presença de anticorpos anti- <i>N. caninum</i> e análise molecular em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e trabalhadores rurais do Estado do Paraná.....	64
TABELA 3 – Presença de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> e análise molecular em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e trabalhadores rurais do Estado do Paraná.....	66
CAPÍTULO IV.....	76
TABELA 1 – Distribuição dos títulos de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> (RIFI-IgG) em trabalhadores rurais da microrregião de Toledo, Paraná, Brasil, 2014.....	82
TABELA 2 – Fatores associados ao risco de trabalhadores rurais sororreagentes e não sororreagentes para <i>T. gondii</i> (ponto de corte $\geq 1:16$), indivíduos procedentes da microrregião de Toledo, Paraná, Brasil, 2014.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
°C	grau centígrado
A	Adenina
C	citossina
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
cnPCR	“Polymerase Chain Reaction” método convencional
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	“Desoxirribonucleotídeos Fosfatados”
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
<i>et al. (et alii)</i>	e outros
FAM	“fluoróforo repórter”
g	grama
G	Guanina
IgG	Imunoglobulina G
Kb	kilo pares de bases
mg	micrograma
M	molar
ng	nanograma
ml	mililitro
mM	milimolar
nm	nanometro
pb	par de bases
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	picomol
PR	Paraná

PUC	Pontifícia Universidade católica do Paraná
q.s.p.	“Quantidade Suficiente Para”
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rtPCR	“Polymerase Chain Reaction” <i>real time</i>
rpm	rotações por minuto
T	Timina
Taq	“ <i>Thermus aquaticus</i> ”
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
NFQ	“quencher não fluorecente”
U	Uracila
U	Unidade de Massa Atômica
UFPR	Universidade Federal do Paraná
xG	Força Centrífuga
μM	micromolar
μM	micromolar
μm	micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1.1 OBJETIVO	19
1.1.1 Objetivo geral	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
2 CAPÌTULO I - REVISÃO GERAL DE LITERATURA	20
2.1 <i>Neospora caninum</i>	20
2.6 <i>Toxoplasma gondii</i>	27
REFERÊNCIAS.....	32
3 CAPÌTULO II - CONCORDÂNCIA NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>Toxoplasma gondii</i> E ANTI- <i>Neospora caninum</i> NO SANGUE E NO LEITE BOVINO PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
3.1 INTRODUÇÃO	43
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.4 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS.....	50
4 CAPÍTULO III - SORODIAGNÓSTICO E INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE <i>Neospora caninum</i> E <i>Toxoplasma gondii</i> EM SERES HUMANOS	53
RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54
4.1INTRODUÇÃO	55
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.4 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	70
5 CAPÍTULO IV - FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO PELO <i>Toxoplasma gondii</i> EM TRABALHADORES RURAIS	76
RESUMO.....	76

ABSTRACT.....	77
5.1 INTRODUÇÃO	78
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	80
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.4 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS	93
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	103
VITA	104

1 INTRODUÇÃO GERAL

O protozoário do gênero *Neospora* pertence ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoea*, ordem *Eucoccidiida* e família *Sarcocystidae* (DUBEY *et al.*, 1988; HOLMDAHL *et al.*, 1994). No gênero *Neospora* duas espécies são conhecidas: *Neospora caninum* (DUBEY, 1988) e *Neospora hughesi* (MARSH *et al.*, 1998).

O protozoário *Toxoplasma gondii* pertencente ao reino Protista, filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoa*, ordem *Eucoccidiida*, subordem *Eimeriina*, família *Sarcocystidae* e subfamília *Toxoplasmatinae* (LEVINE *et al.*, 1980).

O cão é o hospedeiro definitivo do *N. caninum*, assim como o coio, o dingo e o lobo (McAllister *et al.*, 1998; GONDIM *et al.*, 2004; KING *et al.*, 2010; DUBEY *et al.*, 2011). A infecção por *N. caninum* é associada a distúrbios de ordem neurológica em cães (BERTOCCO, 2008), e em relação ao *T. gondii* essa espécie animal pode estar envolvida na transmissão mecânica aos humanos (LINDSAY *et al.*, 1997). Apesar da evidência da presença de anticorpos contra *N. caninum* em doadores sanguíneos humanos, seu potencial zoonótico ainda não foi estabelecido (LOBATO *et al.*, 2006).

A neosporose foi diagnosticada em vários estados brasileiros, mas são poucos os estudos sobre as perdas reprodutivas em bovinos, como repetição de cio, anestro temporário, abortos, nascimento de animais fracos e inviáveis, com sinais neurológicos, ou persistentemente infectados (BRUHN *et al.*, 2013).

A importância econômica da neosporose bovina é atribuída principalmente aos custos associados ao aborto, valor dos fetos, inseminação artificial, diminuição da produção de leite e carne, aumento do descarte e à reposição dos animais. Recentes estudos calcularam perdas econômicas na ordem de 2,8 bilhões de dólares por ano para um grupo de dez países, entre eles o Brasil com perdas estimadas em 153,2 milhões de dólares no mesmo período (REICHEL *et al.*, 2012).

Em seres humanos, um estudo realizado na Califórnia, Tranas *et al.* (1999) detectaram anticorpos anti-*N. caninum* com em 6,7% dos soros humanos analisados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Na Inglaterra, um estudo com 518 trabalhadores rurais e 3.232 pessoas não consideradas “grupo de risco”, McCann *et al.*

(2008) não observaram soropositividade para *N. caninum* através da RIFI, embora tenham sido encontrados bovinos soropositivos na mesma localidade.

Lobato *et al.* (2006) em Minas Gerais, detectaram anticorpos IgG contra *N. caninum* em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e em pacientes com alterações neurológicas. O estudo sugere a possibilidade da neosporose constituir uma parasitose oportunista em pacientes imunocomprometidos.

Os primeiros relatos da toxoplasmose em seres humanos foram realizados nas décadas de 1920 e 1930. Em 1923, JANKÜ observou o agente em um exame histopatológico de retina de uma criança de 11 meses, em Praga, na Tchecoslováquia. TORRES em 1927, no Rio de Janeiro, descreveu o *T. gondii* como causa de meningoencefalite congênita, miocardite e miosite de um recém-nascido. Em 1937, WOLF e COWAN, relataram a doença em várias crianças e demonstraram a transmissão transplacentária, além de isolarem o parasita por inoculação em animal e, na década de 40, a caracterização da doença em indivíduos adultos foi documentada por PINKERTON e WEINMAN (1940) nos Estados Unidos (EUA) (REMINGTON *et al.*, 2001).

A importância da toxoplasmose animal decorre, em primeiro lugar, pelo fato dos animais infectados servirem de fonte direta ou indireta de infecção ao homem e, em segundo, pelas diversas alterações reprodutivas como o aborto, a mortalidade neonatal e os defeitos congênitos consequentes à infecção por *T. gondii*, que representam significativos prejuízos em animais de interesse econômico (SAWADOGO *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2007). Em animais destinados ao consumo humano no Brasil, as soroprevalências para *T. gondii* são de 9,6% em suínos (SUARÉZ-ARANDA *et al.*, 2000), 19,25% em bovinos e 36,9% em ovinos (ROSSI *et al.*, 2011). O consumo de carne crua ou mal cozida é uma fonte de contaminação humana (DUBEY, 1996).

Aproximadamente 30% da população humana possui anticorpos contra esse protozoário (PENA *et al.*, 2006). No Brasil, a soroprevalência varia de 26,17% a 80% (CANTOS, 2000; BORGUEZAN *et al.*, 2014). A prevalência de indivíduos soropositivos para toxoplasmose aumenta com a idade e difere dependendo dos padrões culturais da população, hábitos alimentares e procedência urbana ou rural. Em regiões tropicais ou subtropicais de clima úmido, a prevalência é mais elevada, pois este tipo de clima

favorece a sobrevivência dos oocistos no meio ambiente (GUIMARÃES *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2002; AMENDOEIRA *et al.*, 2003).

O diagnóstico destas protozooses pode ser realizado através das técnicas que revelam a presença do parasito, como histologia, imunohistoquímica e amplificação dos genes (PCR), ou por técnicas que evidenciam a presença de anticorpos, como reação de imunofluorescência indireta (RIFI), métodos imunoenzimáticos (ELISA) e soroaglutinação (JOURNEL e PITEL, 2001).

Segundo Dubey e Lindsay (1996), na RIFI existe a possibilidade de reação cruzada entre *N. caninum* e *T. gondii*, sendo importante nos estudos sorológicos pesquisar anticorpos para ambos os protozoários. No entanto, essas reações cruzadas são relativamente baixas ou nulas, porque nesse método são avaliados os antígenos de superfície (HADDAD, DOHOO e VANLEEWEN, 2005).

Existem estudos verificando a soroprevalência para o *T. gondii* em trabalhadores rurais no Paraná, porém estes são escassos, limitando-se a trabalhos realizados na região norte e sudoeste do estado (GARCIA e NAVARRO, 1995; GARCIA *et al.*, 1999; DAGHER *et al.*, 2004; MILLAR *et al.*, 2007), havendo assim necessidade de ampliar os estudos neste tipo de indivíduos em outras regiões do estado, como a região Oeste.

A presença de anticorpos não evidencia uma infecção ativa, apenas que o indivíduo foi exposto ao agente, faz-se necessária a pesquisa através de técnicas que revelem o DNA do parasita em amostras clínicas, a técnica molecular mais utilizada para este fim é a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), no Paraná não foi encontrado estudo no que se refere à pesquisa molecular de *N. caninum* e *T. gondii* em amostras de sangue periférico humanas.

Considerando os fatores como importância da atividade pecuária no país, principalmente a bovinocultura leiteira, o convívio próximo de trabalhadores rurais com animais e o possível potencial zoonótico da neosporose, deveria ser realizado um levantamento sorológico diagnóstico em populações humanas, semelhante ao que ocorre com a pesquisa de anticorpos do *T. gondii* em indivíduos cuja ocupação os coloca em contato direto com animais de produção soropositivos, uma vez que diversos trabalhos vêm relatando a presença desse parasita em animais de produção como um

fator de risco à soropositividade para toxoplasmose humana (TENTER *et al.*, 2000; DAGUER *et al.*, 2004; ALVARADO-ESQUIVEL *et al.*, 2011).

Esta Tese está dividida em quatro capítulos:

- O Capítulo I aborda a revisão bibliográfica geral sobre o *N. caninum* e o *T. gondii*;
Os capítulos II a IV estão escritos na forma de artigos científicos e descrevem os resultados obtidos no presente estudo:
- Capítulo II - Concordância na detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* no sangue e no leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI)
- Capítulo III - Sorodiagnóstico e investigação molecular de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em seres humanos
- Capítulo IV - Fatores de risco associados à infecção pelo *Toxoplasma gondii* em trabalhadores rurais

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo Geral

Realizar o diagnóstico sorológico para *N. caninum* e *T. gondii* em bovinos leiteiros da microrregião de Toledo, PR; investigar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação de polimerase em cadeia em trabalhadores rurais e indivíduos imunodeprimidos portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) do Estado do Paraná e avaliar os fatores de risco associados infecção por *T. gondii* em trabalhadores rurais da microrregião de Toledo, PR.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a aplicabilidade da pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* em amostras de leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e sua concordância com a detecção desses anticorpos em amostras de soro sanguíneo, simultaneamente coletadas das mesmas vacas.
- Verificar a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* em bovinos leiteiros;
- Analisar os fatores de risco associados infecção pelo *T. gondii* em trabalhadores rurais (pecuaristas) da microrregião de Toledo, oeste do Paraná;
- Investigar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação de polimerase em cadeia (PCR convencional e PCR em tempo real), em trabalhadores rurais e indivíduos imunodeprimidos portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), do Estado do Paraná.

2 CAPÍTULO I - REVISÃO GERAL DE LITERATURA

2.1 *Neospora caninum*

O *Neospora caninum* é um protozoário parasito, pertencente ao filo *Apicomplexa*, família *Sarcocystidae*, subfamília *Toxoplasmatinae*. É possível que até 1988, por sua similaridade estrutural e biológica com o *Toxoplasma gondii*, esse parasito tenha sido diagnosticado erroneamente e mantido oculto à luz das investigações científicas. A partir do isolamento em cães com neuropatia, foi descrito pela primeira vez por Bjerkas *et al.*, em 1984, como um protozoário semelhante ao *T. gondii* e foi denominado *N. caninum* em 1988 (DUBEY *et al.*, 1988).

Somente em 1998, McAllister *et al.* (1998) identificaram os cães (*Canis familiaris*) como hospedeiros definitivos do *N. caninum* quando diagnosticaram oocistos nas fezes dos cães alimentados com tecidos de camundongos contendo cistos teciduais de *N. caninum*. Os estudos experimentais de McAllister *et al.* (1998) foram definitivos no conhecimento da biologia de *N. caninum*, pois revelaram o papel do cão como hospedeiro definitivo e, conseqüentemente, o modo de transmissão horizontal. Mais recentemente, observou-se que o coiote (*Canis latrans*) também pode eliminar oocistos nas fezes, demonstrando ser também hospedeiro definitivo de *N. caninum* (GONDIM *et al.*, 2004), assim como os dingos (*Canis lupus dingo*) (KING *et al.*, 2010) e o lobo cinzento (*Canis lupus*) (DUBEY *et al.*, 2011).

2.2 BIOLOGIA E TRANSMISSÃO DO *N. caninum*

O ciclo de vida do *N. caninum* é composto por três estágios infecciosos: taquizoítas; bradizoítos nos cistos teciduais e esporozoítos nos oocistos. Taquizoítas e cistos teciduais são encontrados intracelularmente nos hospedeiros intermediários e definitivos (DUBEY *et al.*, 2002). Oocistos não esporulados de *N. caninum*, são excretados pelas fezes de cães infectados (McALLISTER *et al.*, 1998; LINDSAY *et al.*, 1999).

Cães excretam oocistos após cinco ou mais dias após a ingestão de tecidos de animais infectados (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007). A esporulação dos oocistos ocorre dentro de 24 horas após a excreção, mas depende das condições de umidade, temperatura e oxigenação do ambiente. A quantidade de oocistos excretados e o período de excreção dos oocistos bem como o período pré-patente variam, e encontram-se entre 5 e 30 dias (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007).

O ciclo biológico deste parasito envolve hospedeiro definitivo e intermediário caracterizando-se, portanto, em um ciclo heteroxeno, no qual a fase assexuada ocorre no hospedeiro intermediário e a sexuada ocorre no hospedeiro definitivo (DUBEY, 2003).

Em bovinos, os dois mecanismos de infecção por *N. caninum* são a transferência do parasita da mãe para o feto (transmissão vertical ou infecção congênita) e a ingestão de oocistos esporulados (transmissão horizontal ou infecção pós-natal) (FIGURA 1) (McALLISTER e LATHAM, 2002).

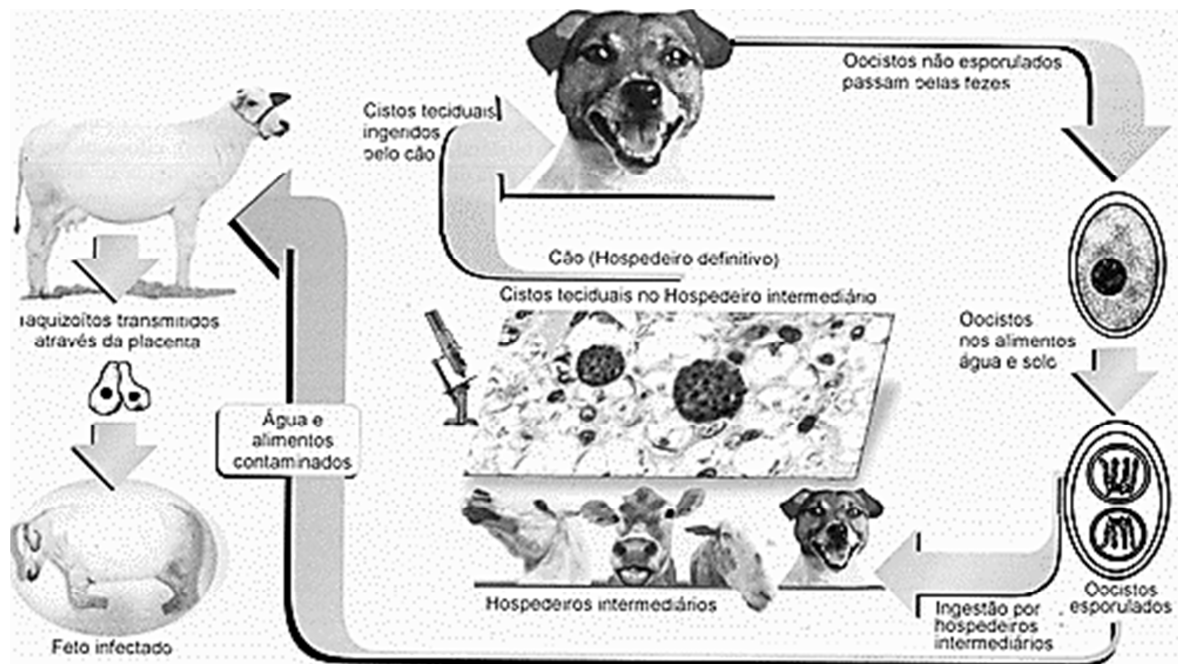


FIGURA 1 – Ciclo biológico do *N. caninum* com seus hospedeiros.

Fonte: GIRALDI *et al.* (2001).

Na transmissão horizontal, os hospedeiros intermediários ingerem alimentos ou água contaminada com oocistos de *N. caninum*. Esta via foi viável somente em experimentos laboratoriais com camundongos (McALLISTER *et al.*, 1998). Esta forma de transmissão também pode acontecer quando animais ingerem cistos presentes em tecidos de qualquer hospedeiro intermediário. Nos cães, a transmissão horizontal ocorre principalmente quando ingerem cistos presentes no sistema nervoso central (ANDERSON, ANDRIANARIVO e CONRAD, 2000; DUBEY, 2003) e em placentas infectadas de bovinos (PETERS *et al.*, 2001).

A transmissão vertical ocorre por via materno - fetal, sendo que nesta a infecção pode ser recrudescente ou primária. O parasito consegue romper a barreira transplacentária e atingir o feto. Até o momento sabe-se que este tipo de infecção é mais frequente em bovinos, o que leva a vários problemas econômicos. Experimentalmente, camundongos podem ser infectados lactogenicamente (COLE *et al.*, 1995) e bezerros podem ser infectados oralmente por taquizoítas presentes no leite (UGGLA *et al.*, 1998).

1.1 *N. caninum* NA ESPÉCIE BOVINA

Os bovinos são considerados os mais importantes hospedeiros intermediários deste protozoário, neles a infecção se mantém através da transmissão vertical, sendo pouco frequente a transmissão horizontal (McALLISTER *et al.*, 1998). As vacas podem infectar-se ao ingerir pastagem ou água contaminadas por oocistos esporulados de *N. caninum* oriundos de fezes de canídeos que ingeriram músculos ou vísceras contendo cistos teciduais de *N. caninum* (ANDREOTTI, 2001).

A neosporose é a maior causa de abortamento em bovinos leiteiros, podendo causar alterações reprodutivas e bezerros doentes (DUBEY, 2011). As vacas de todas as idades podem abortar, a partir de três meses de gestação até o termo, porém, a maioria dos abortamentos ocorre entre o quinto e o sexto mês de gestação. Os fetos podem morrer no útero, serem reabsorvidos, mumificados, autolisados, nascerem

mortos, nascerem vivos com sinais clínicos, nascerem vivos e clinicamente normais, mas infectados (THURMOND *et al.*, 1995).

No Brasil, o *N. caninum* já foi isolado de cão (GONDIM *et al.*, 2001), de feto bovino e de bezerro com cegueira congênita (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2003; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2004), de bezerros saudáveis (PEREIRA *et al.*, 2010) e de búfalos (RODRIGUES *et al.*, 2004), respectivamente, nos Estados da Bahia, Paraná, Goiás e São Paulo. A neosporose está difundida em vários estados do país, como Bahia, São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais (GONDIM *et al.*, 1999; COSTA *et al.*, 2001; CORBELLINI *et al.*, 2002; ANDREOTTI *et al.*, 2006). No Paraná, anticorpos anti-*N. caninum* foram detectados em bovinos leiteiros na região norte na última década no sudoeste e centro-oeste do estado (RAGOZO *et al.*, 2003; GUIMARÃES JÚNIOR *et al.*, 2004; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2008; CAMILLO *et al.*, 2010).

1.2 *N. caninum* NA ESPÉCIE HUMANA

Quanto à infecção em humanos, desde que dois macacos *rhesus* foram experimentalmente infectados por *N. caninum* têm-se investigado seu potencial zoonótico (HO *et al.*, 1997). Um dos primeiros trabalhos que comprovou a presença de anticorpos contra o parasito na espécie humana foi realizado em 1999 na Califórnia. Foram analisadas 1029 amostras de soros advindos de doadores de sangue, observando-se que, utilizando o teste de imunofluorescência indireta, 6,7% ou 69 destas amostras, diluídas em 1:100, foram positivas para anticorpos contra *N. caninum*, sendo que, dentre estas, 50 não apresentavam anticorpos contra *T. gondii* (TRANAS *et al.*, 1999).

Petersen *et al.* (1999) pesquisaram anticorpos anti-*N. caninum* em um grupo de mulheres dinamarquesas com abortamentos repetidos, de causa desconhecida, e não encontraram resultado positivo. Sugeriram, então, que anticorpos devem ser investigados especificamente em mulheres com quadros reprodutivos aliados a sinais neurológicos.

Na Bahia, foram realizados estudos analisando-se amostras de soros dos seguintes grupos de indivíduos: a) mulheres que apresentavam ou não uma história frequente de perda fetal; b) indivíduos normais; e c) pacientes infectados com o vírus HIV. Estudando-se 80 amostras de soros de cada grupo foi encontrado soropositividade de 5%, 3,8% e 15% respectivamente, das amostras analisadas utilizando-se o teste de imunofluorescência indireta (MAGALHÃES *et al.*, 2002).

Em 2006, em Minas Gerais, foi encontrada alta prevalência de anticorpos IgG contra *N. caninum*, em pacientes HIV positivos, pacientes com desordens neurológicas, em recém-nascidos e indivíduos saudáveis, respectivamente (LOBATO *et al.*, 2006). O estudo demonstrou maior índice de soropositividade para *N. caninum* em pacientes imunodeprimidos. Lobato e colaboradores (2006) consideraram também que as soropositividades para *N. caninum* e para *T. gondii* estavam significativamente associadas nesses dois grupos de pacientes examinados. Observaram, no mesmo estudo, 6% de indivíduos saudáveis positivos para anticorpos anti-*N. caninum*, sem soropositividade concomitante para *T. gondii*.

Na Inglaterra, um estudo realizado com população geral inglesa e população humana considerada de alto risco (trabalhadores rurais) para infecção por *N. caninum*, não foram encontrados anticorpos, demonstrando que a infecção em humanos é incomum na Inglaterra (McCann *et al.*, 2008).

Em um estudo recente, Benetti e colaboradores (2009) avaliaram a frequência de anticorpos anti-*N. caninum*, examinados por meio da reação de RIFI, em amostras de soros de pessoas que procedentes de propriedades rurais da região sudoeste do Estado de Mato Grosso, Brasil. As amostras de soros humanos reagentes foram testadas novamente por *western-blotting* para confirmação dos resultados. Anticorpos anti-*N. caninum* foram encontrados em 10,5% das amostras (7/64).

Também em 2009, um estudo no Egito verificando a soroprevalência de *T. gondii* e *N. caninum* em soros de: coelhos, bovinos e seres humanos. Este estudo analisou 101 amostras provenientes de mulheres grávidas e revelou uma soroprevalência de 7,92% para presença de *N. caninum* (IBRAHIM *et al.*, 2009).

Até o presente momento não foi comprovada a relação entre infecção por *N. caninum* e a ocorrência de abortos espontâneos e repetidos em mulheres (PETERSEN

et al., 1999; IBRAHIM *et al.*, 2009). Em um *screening* realizado na França, em amostras de indivíduos soronegativos e soropositivos para o HIV, nenhum dos indivíduos imunocompetentes apresentou anticorpos para *N. caninum*. No grupo de indivíduos de imunocomprometidos quatro foram positivos para presença de anticorpos de *N. caninum*, sendo três deles positivos em altos títulos para *T. gondii*, o que sugere reativação sorológica. Não foi encontrada evidência de infecção ou exposição de pessoas imunocompetentes ao *N. caninum*, porém não pode ser descartada a chance de infecção associada com infecção ou reativação por *T. gondii* em indivíduos imunocomprometidos (ROBERT-GANGNEUX e KLEIN, 2009).

2.5 DIAGNÓSTICO DO *N. caninum*

Os métodos sorológicos comumente utilizados são o teste imunoenzimático – ELISA (“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”) e a reação da imunofluorescência indireta (RIFI). Os métodos diretos são os exames histopatológico, imunohistoquímico e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (TRANAS *et al.*, 1999). Os testes sorológicos são ferramentas importantes para estudar a epidemiologia da neosporose, pois podem ser aplicados *antemortem* e fornecer informações sobre a infecção no rebanho. Entretanto, diferenças na validade dos testes e metodologia empregada nos laboratórios podem influenciar o diagnóstico (DUBEY e SCHARES, 2006; DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007).

A RIFI foi o primeiro teste sorológico utilizado para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* e apresenta uma boa sensibilidade e especificidade, sendo considerado teste de referência (padrão ouro) (ATKINSON *et al.*, 2000). Na RIFI pode-se utilizar taquizoítas intactos que detectam anticorpos contra antígenos presentes na superfície do parasito. Este teste tem sido utilizado para detectar anticorpos de várias espécies animais, incluindo cães, raposas, gatos, bovinos, porcos, cabras, búfalos, cavalos, roedores, primatas e pessoas (BJORKMAN e UGGLA, 1999).

Entretanto Dubey (2003) afirma que esta técnica não apresenta um ponto de corte definitivo, que se justifica pela incerteza do diagnóstico sorológico em animais

cronicamente infectados e da viabilidade dos soros testados. O diagnóstico de aborto por *N. caninum* não deve ser baseado somente no método sorológico (SAGER *et al.*, 2001; PEREIRA-BUENO *et al.*, 2003). É necessário demonstrar o protozoário no feto e, se possível, incluir as lesões histopatológicas para confirmar o diagnóstico, excluindo outras causas de aborto (PEREIRA-BUENO *et al.*, 2003; DUBEY e SCHARES, 2006).

A PCR pode ser usada para detectar especificamente *N. caninum* e para diferenciar a infecção por outros protozoários (GREENE, DUBEY e LAPPIN, 2006). No caso da PCR bovinos, as principais amostras escolhidas para detecção do parasito são feto, líquido amniótico, placenta, leite, amostras de fezes e do ambiente, como a água (DUBEY e SCHARES, 2006).

A utilização de técnicas de diagnóstico molecular, baseadas na detecção de porções do genoma de *N. caninum*, oferece possibilidade de superar alguns problemas de diagnóstico, principalmente em relação à sensibilidade insuficiente (PAYNE e ELLIS, 1996; MEDINA *et al.*, 2006). Desde meados da década de 1990, várias foram as estratégias desenvolvidas nesse sentido, destacando-se as técnicas de sequenciamento de material genômico clonado (MARSH; GAUTHIER; VASTA, 1995), PCR simples e “*Nested*” (ELLIS, 1998; PAULA *et al.*, 2004), testes de hibridização de DNA (MÜLLER *et al.*, 1996), “*multiplex*” PCR (MESECK *et al.*, 2005) e “*real-time*” PCR (COLLANTES-FERNÁNDEZ *et al.*, 2002; NISHI *et al.*, 2009).

Os genes alvos mais utilizados na técnica da PCR são as sequências de rDNA (18S rDNA, 28S rDNA, ITS1) e o gene pNc5. Os iniciadores para as sequências do gene pNc5 são o Np6 e Np21 (YAMAGE *et al.*, 1996). A sensibilidade e a especificidade de uma PCR são influenciadas não somente pela seleção do DNA alvo e pelos pares de iniciadores, mas também pelos protocolos, pela coleta e conservação da amostra, extração e purificação da amostra de DNA, pelos reagentes apropriados, pelo programa no termociclador e análises dos fragmentos amplificados (DUBEY e SCHARES, 2006).

2.6 *Toxoplasma gondii*

No início do século XX, Nicolle e Manceaux (1908) relataram a presença de um parasito intracelular no baço e no fígado de um pequeno roedor popularmente conhecido como gundi (*Ctenodactylus gundi*), no Norte da África. No estudo os autores relataram como uma forma particular de Leishmania, denominando-o *Leishmania gundi*. No Brasil, Splendore (1908) observou o mesmo parasito em coelho e também o comparou ao agente da leishmaniose visceral. Em 1909, no entanto, os primeiros autores constataram que se tratava de um novo parasito, sendo identificado o gênero *Toxoplasma*, nome derivado da união da palavra grega *toxon* (arco) em referência ao formato do parasito e *plasma* (forma) (NICOLLE e MANCEAUX, 1909).

Este protozoário é um coccídio intracelular obrigatório, de distribuição mundial, podendo ser encontrado em grande variedade de hospedeiros vertebrados (DUBEY e BEATTIE, 1988; CARRUTHERS, 2002). O *T. gondii* é classificado no Filo *Apicomplexa*, Classe *Sporozoea*, Subclasse *Coccidia*, Ordem *Eucoccidiida*, Família *Sarcocystidae* e Subfamília *Toxoplasmatinae* (TENTER, 1999).

2.7 BIOLOGIA E TRANSMISSÃO DO *T. gondii*

O *T. gondii* é capaz de infectar e se replicar dentro de qualquer célula nucleada mamífera ou aviária (BLACK e BOOTHROYD, 2000). Os felídeos são considerados espécies-chave na transmissão de *T. gondii* para o homem e outras espécies animais por serem os únicos hospedeiros que albergam o parasita no epitélio intestinal, onde ocorre o desenvolvimento sexual, e excretam os oocistos nas fezes (DUBEY e BEATTIE, 1988; DUBEY, 2010). Um único gato pode eliminar milhões de oocistos, que se tornam infectantes após esporulação no ambiente (DUBEY e BEATTIE, 1988).

Os oocistos esporulados são muito resistentes às condições ambientais, podendo permanecer viáveis por até 18 meses (DUBEY, 2008). As três principais vias de disseminação são a transmissão transplacentária, a ingestão de tecidos infectados com cistos contendo bradizoítas ou a ingestão de alimentos ou água contaminadas com oocistos (AMENDOEIRA *et al.*, 1999; TENTER *et al.*, 2000; HILL e DUBEY, 2002).

O ciclo biológico do parasita é dividido em duas fases: fase assexuada (extra-intestinal), que ocorre nos hospedeiros intermediários e definitivos, e a fase sexuada (entero-epitelial), que ocorre somente nos hospedeiros definitivos (FIGURA 2) (TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000).

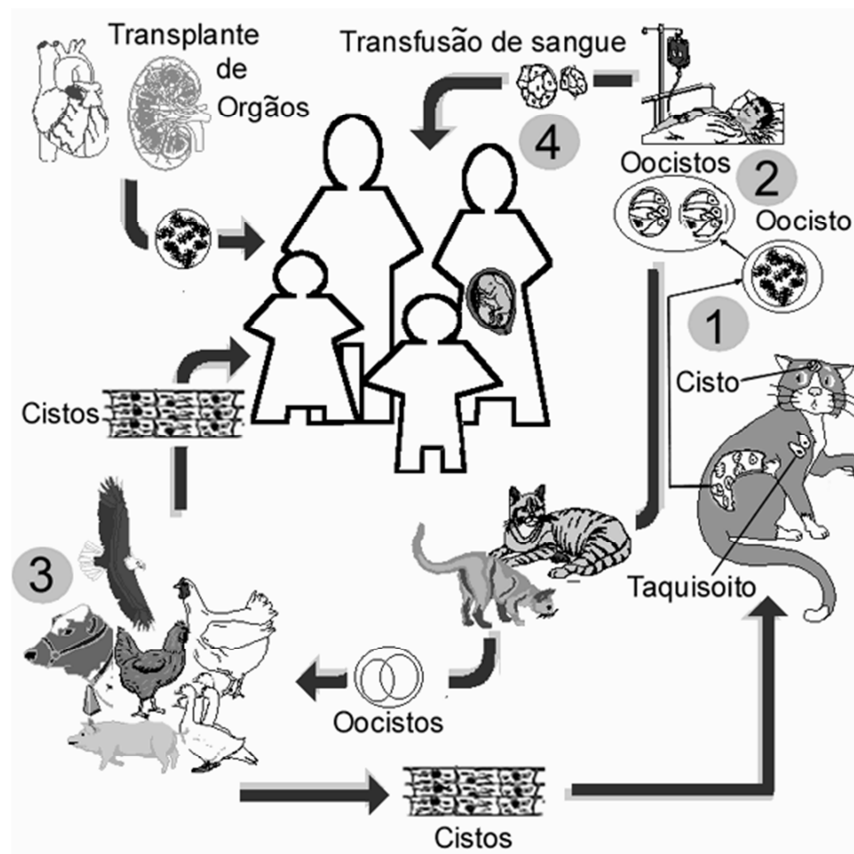


FIGURA 2 – Ciclo biológico do *T. gondii* com seus hospedeiros.

2.8 *T. gondii* NA ESPÉCIE BOVINA

Os bovinos são mais resistentes à toxoplasmose, mas, quando presente, os sintomas clínicos mais comuns são: febre, inapetência, diarreia, dispneia, descargas nasais e tosse (DUBEY, 1983; OLIVEIRA *et al.*, 2001) e aborto (CANADA *et al.*, 2002). Em bovinos a infecção ocorre principalmente através da ingestão de oocistos presentes nos alimentos (pastagem, ração, etc.) e solo contaminados (DUBEY e BEATTIE, 1988).

No Brasil, o *T. gondii* já foi isolado de vacas prenhas abatidas em um matadouro para consumo humano e de seus respectivos fetos (MACEDO *et al.*, 2012). A prevalência nacional de anticorpos anti-*T. gondii* em bovinos gira em torno de 1% a 49,17% de animais positivos (GONDIN *et al.*, 1999; COSTA *et al.*, 2001). No Paraná a soroprevalência de bovinos varia de 26% a 48,5%, estes dados são relativos a estudos realizados no sudoeste e norte do estado (MARANA *et al.*, 1994; GARCIA *et al.*, 1999; DAGHER *et al.*, 2004; OGAWA *et al.*, 2005).

2.9 *T. gondii* EM SERES HUMANOS

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, sendo encontrada em todos os continentes, nos mais variados climas (AMENDOEIRA *et al.*, 1999; REY e REY, 2001). O *T. gondii* é um dos parasitos mais comuns encontrados em todo o mundo e sua prevalência está estimada em 1 a 2 bilhões de pessoas (TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000; PAPPAS, ROUSSOS e FALAGAS, 2009), porém, a frequência da infecção é extremamente variável nas diferentes regiões do planeta. Nos Estados Unidos, estima-se que 26 a 40% da população esteja infectada, enquanto nas Américas Central e do Sul e na Europa as estimativas variam entre 50 a 80% (HILL e DUBEY, 2002). A variabilidade da frequência da infecção está ligada a diversos fatores, tais como: padrões culturais da população, hábitos alimentares, idade, procedência rural ou urbana, entre outros (AMENDOEIRA *et al.*, 1999; SPALDING *et al.*, 2005).

A transmissão ocorre, principalmente, por três vias: pela ingestão ou manuseio de carne crua ou mal passada (principalmente ovina e suína) contendo cistos com bradizoítas; pela ingestão de oocistos que, após sofrerem a esporulação, podem contaminar água e alimentos crus; e pela passagem de taquizoítas por via transplacentária (AMENDOEIRA, 1995).

A ingestão de leite de vaca ou de cabra, ovos de galinha, patos e outras espécies contaminadas com taquizoítas, pode ser considerada uma forma potencial de transmissão do *T. gondii*, embora os parasitos sejam raramente isolados nestes produtos (TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000; HIRAMOTO *et al.*, 2001).

A transmissão pode ocorrer, ainda, por transfusões sanguíneas (AMORIM, 2008), pelo transplante de órgãos, acidentes de laboratório e a de maior importância clínica, a transplacentária (vertical) quando a gestante adquire a primeira infecção durante a gravidez, apresentando a fase aguda e podendo transmitir o *T. gondii* ao feto (TENTER, HECKEROTH e WEISS, 2000).

2.10 DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE

Semelhante à infecção por *N. caninum*, a infecção por *T. gondii* leva a uma resposta humoral no indivíduo, que pode ser demonstrada em diferentes testes. Vários testes têm sido utilizados no diagnóstico desta patologia. O diagnóstico da toxoplasmose pode ser clínico, epidemiológico ou laboratorial, sendo que o primeiro é muito difícil quando se trata da toxoplasmose adquirida, pois esta, em 90% dos casos, apresenta-se assintomática ou, se for sintomática, pode apresentar sinais e sintomas genéricos que são sugestivos para uma série de outros processos infecciosos. Para maior confiabilidade no diagnóstico e a confirmação da infecção por *T. gondii*, é imprescindível o uso de técnicas laboratoriais padronizadas (AMENDOEIRA *et al.*, 1999).

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser feito por métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares, que incluem o isolamento do *T. gondii* pela inoculação de amostras biológicas em camundongos, isolamento em cultura de células, pesquisa de antígenos e anticorpos, e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (DA COSTA *et al.*, 2007). Há vários testes sorológicos válidos, sendo os mais comuns, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), hemoaglutinação indireta (IHA), Fixação de Complemento (FC), teste Sabin-Feldmann ("dye test") e ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) (SIKES, 1982).

O diagnóstico molecular através de PCR surgiu no cenário da toxoplasmose há cerca de 20 anos e tem se mostrado uma alternativa mais sensível (92-97,4%) e mais específica (100%) para o diagnóstico da toxoplasmose do que os outros métodos citados (SPALDING *et al.*, 2002). Os principais tipos de PCR utilizados no diagnóstico

da toxoplasmose são: a PCR convencional (cnPCR) seguida de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, a Nested PCR (nPCR) e mais recentemente a PCR quantitativa em tempo real (qrtPCR) (ABDUL-GHANI, 2011). O uso da PCR no diagnóstico da toxoplasmose tem sido bem sucedido. Para esse propósito são utilizadas diferentes amostras biológicas como fluído amniótico, placenta, sangue total periférico, fluído cerebroespinal, lavado broncoalveolar, fluído vítreo, humor aquoso e fluídos pleural e peritoneal (REMYINGTON *et al.*, 2004).

De maneira geral, não existe consenso sobre os diferentes passos durante o processo de diagnóstico da toxoplasmose através da PCR, nem na extração do DNA, nos alvos ou nos iniciadores utilizados. Essas variações metodológicas constituem obstáculo para a padronização dos métodos de diagnóstico assim como a comparação dos resultados entre diferentes laboratórios (STERKERS *et al.*, 2010).

Diferentes iniciadores têm sido utilizados para a realização do diagnóstico molecular (JONES *et al.*, 2000). Inicialmente, o alvo comumente utilizado era o gene P30 de cópia única e que codifica o principal antígeno de superfície do *T. gondii* (SAG1) (BURG *et al.*, 1989; ABDUL-GHANI, 2011). Em busca de uma melhor sensibilidade outras sequências-alvo foram utilizadas. De acordo com a literatura, um dos genes mais utilizados é o B1 (2,2Kb) que se encontra repetido em 35 cópias no genoma do *T. gondii*. Esse gene B1 foi descrito por Boothroyd e colaboradores em 1987 e demonstrou alta sensibilidade sendo capaz de detectar até um parasita em cerca de 100 mil células hospedeiras (BURG *et al.*, 1989). Além disso, o B1, por ser uma região conservada do genoma do *T. gondii*, é altamente específico (FILISSETTI *et al.*, 2003; KOMPALIC-CRISTO *et al.*, 2005; ABDUL-GHANI, 2011).

Outro alvo do genoma utilizado para detecção molecular de *T. gondii* é a sequência de 529 pb que vem sendo descrita como mais sensível do que a sequência do gene B1, pois é repetida de 200-300 vezes (HOMAN *et al.*, 2000).

REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI, R. Polymerase chain reaction in the diagnosis of congenital toxoplasmosis: more than two decades of development and evaluation. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 505-512, 2011.
- ALVARADO-ESQUIVEL, C. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection and liver disease: a case-control study in a Northern Mexican population. **Parasitology Vectors**, v. 4, n. 1, p. 75, 2011.
- AMENDOEIRA, M. R. R. *et al.* *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909) (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. **Revista Souza Marques**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.15-29, 1999.
- AMENDOEIRA, M. R. R. *et al.* Inquérito sorológico para a infecção por *Toxoplasma gondii* em ameríndios isolados, Mato grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.6, p.671-676, 2003.
- AMORIM, L. Toxoplasmose e transfusão de sangue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30 n. 4, 2008
- ANDERSON, M. L.; ANDRIANARIVO, A. G.; CONRAD, P. A. Neosporosis in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 417-431, 2000.
- ANDREOTTI, R. Neosporose um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino, **A Hora Veterinária**, n. 122, p. 65-67, 2001.
- ANDREOTTI, R. *et al.* Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3, p. 375-379, 2006.
- ATKINSON, R. *et al.* Progress in the Serodiagnosis of *Neospora caninum* Infections of Cattle. **Parasitology Today**, v. 16, n. 3, p. 110-114, 2000.
- BENETTI, A. H. *et al.* Inquiry of antibodies anti-*Neospora caninum* in dairy cattle, dogs and rural workers of the south-west region of Mato Grosso State. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 29-33, 2009.
- BERTOCCO, P. B.; BERTOCCO, P. C.; NEVES, F. M. Infecção por *Neospora caninum* em cães e outros carnívoros, In: **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 10, 2008.
- BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 1497-1507, 1999.

BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 607-623, 2000.

BORGUEZAN, C. *et al.* Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em indígenas da etnia Terena, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 66, n. 1, 2014.

BRUHN, F. R. *et al.* Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in southeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 45, n. 5, p. 1093-1098, 2013.

BURG, J. L. *et al.* Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1787-1792, 1989.

CAMILLO, G. *et al.* Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do estado do Paraná; Antibodies to *Neospora caninum* in dairy cattle in Southwest of Paraná State. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1511-1513, 2010.

CANADA, N. *et al.* Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from naturally infected aborted bovine fetuses. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1247-1248, 2002.

CANTOS, G. A. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, n.4, p. 335-341, 2000.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E. *et al.* Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1194-1198, 2002.

COLE, R. A. *et al.* Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. **The Journal of Parasitology**, p. 730-732, 1995.

CORBELLINI, L.G. *et al.* Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 3, p. 195-202, 2002.

COSTA, G. H. N. *et al.* Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 1, p. 61-66, 2001.

DA COSTA, T. L. *et al.* Diagnóstico clínico e laboratorial da toxoplasmose. **NewsLab**, v. 85, p. 88-104, 2007.

- DAGUER, H. *et al.* Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1133-1137, 2004.
- DUBEY, J. P. Distribution of cysts and tachyzoites in calves and pregnant cows inoculated with *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 13, n. 3, p. 99-211, 1983.
- DUBEY, J.P. *et al.* Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 193, p. 1259-1263, 1988.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animals and Man**. CRC Press, Inc., 1988.
- DUBEY, J. P. Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. **Journal of Parasitology**, v.82, p.951-956, 1996.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, p.1-59, 1996.
- DUBEY, J. P. *et al.* Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 929-946, 2002.
- DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1, p. 1-34, 2006.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.
- DUBEY, J. P.; JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1257-1278, 2008.
- DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of Animals and Humans**. CRC press, 2010.
- DUBEY J.P. *et al.*, Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**. v.181, p.382– 387, 2011.
- ELLIS, J. T. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1053-1060, 1998.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. Levantamento soroepidemiológico da toxoplasmose em moradores da zona rural do município de Guaraci - Paraná - Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.16, p.63-67, 1995.

GARCIA, J. L. *et al.* Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 01, p. 91-97, 1999.

GUIMARÃES, A. C. S. *et al.* Detecção de anticorpos IgG em pacientes com diferentes manifestações de toxoplasmose. **Revista Laes e Haes**, v.5, n.121, 1999.

GONDIM, L. F. P. *et al.* Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 86, p. 71-75, 1999.

GONDIM, L.F.P. *et al.* Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 1-7, 2001.

GONDIM, L.F.P. *et al.* Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.34, p.159-161, 2004.

GUIMARÃES JUNIOR, J. S. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.1-8, 2004.

GREENE, C. E.; DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R. Toxoplasmosis anneosporosis. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**, p.754-774, 2006.

HADDAD, J. P.; DOHOO, I.R.; VANLEEWEN, J.A. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle-a Canadian perspective. **Canadian Veterinary Journal**, v. 46, p. 230-243, 2005.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 10, p. 634-640, 2002.

HIRAMOTO, R. M. *et al.* Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. **Revista de Saúde Pública**, v.35, n.2, 2001.

HO, M. S. *et al.* Detection of *Neospora* from tissues of experimentally infected rhesus macaques by PCR and specific DNA probe hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1740-1745, 1997.

HOLMDAHL, O. J. M. *et al.* The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. **FEMS Microbiology Letters**, v. 119, p. 87-192, 1994.

HOMAN, W. L. *et al.* Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International journal for parasitology**, v. 30, n. 1, p. 69-75, 2000.

IBRAHIM, H. M. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in northern Egypt. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 2, p. 263-267, 2009.

JOURNEL, C.; PITEL, P. H. Diagnóstico da neosporose em bovinos, **A Hora Veterinária**, n. 22, p. 70-72, 2001.

KING, J. S. *et al.* Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **The International Journal for Parasitology**, v.40, n. 8, p. 945-950, 2010.

LEVINE, N. D. *et al.* Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 73, p. 27-33, 1997.

LINDSAY, D. S. *et al.* Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 73, n. 1-2, p. 27-33, 1997.

LOBATO, J. *et al.* Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 13, n. 1, p. 84-89, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil. **The Veterinary Record**, v. 153, n. 12, p. 366-367, 2003.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n. 3, p. 103-109, 2004.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. S1, p. 191-196, 2008.

MACEDO, M. F. S. B. *et al.* Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy cows (*Bos taurus*) slaughtered. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 74-77, 2012.

MAGALHÃES, F. B. *et al.* Serologic evidences of human *Neospora caninum* infection in Brazil. In: Meeting of Brazilian Society of Immunology, Salvador. **Anais...** Salvador: Brazilian Society of Immunology, 2002, p. 114.

MAIA, L. P. *et al.* Soroprevalência de toxoplasmose na região do Pontal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 4, 2012.

MARANA, E. R. M. *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em rebanhos de bovinos de leite do norte do Paraná–Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 16, n. 1, p. 40-42, 1995.

MARSH, A. E. *et al.* Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **Journal of Parasitology**, v. 84, n. 05, p. 983-991, 1998.

McALLISTER, M. M. *et al.* Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **The International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1473-1478, 1998.

McALLISTER, D.; LATHAM, S. *Neospora* 2001. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 4-5, 2002.

McCANN, C. M. *et al.* Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 978-980, 2008.

MEDINA, L. *et al.* Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3, p. 187-191, 2006.

MESECK, E. K. *et al.* Use of a multiplex polymerase chain reaction to rapidly differentiate *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* in an adult dog with necrotizing myocarditis and myocardial infarct. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 565–568, 2005.

MILLAR, P. R. *et al.* Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em trabalhadores de um matadouro de suínos e em indivíduos com outras atividades na cidade de Palmas, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, n.1, p.292-295, 2007.

MÜLLER, N. *et al.* Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2850-2852, 1996.

NISHI, S. M. *et al.* Emprego da RT-PCR em tempo real para a quantificação da expressão de genes associados à resposta imune em bezerros bovinos experimentalmente infectados por *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 8-14, 2009.

OGAWA, L.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, O.; GONDIM, L. F. P.; NAVARRO, I. T. Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil, **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, 2005.

OLIVEIRA F. C. R.; COSTA, A.J.; SABATINI. G.A. Clínica e hematologia de *Bos indicus*, *Bos taurus*, e *Bubalus bubalis* inoculados com oocistos de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae). **Ciência Rural**, v. 31, p. 621-626, 2001.

GIRALDI, J. H., *et al.* Neosporose canina. **Clínica Veterinária**, n.34, p.50-56, 2001.

PAGE, F. C. *et al.* A newly revised classification of the Protozoa. **The Journal of Protozoology**, v.27, p.37-58, 1980.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M.E. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **Internal Journal of Parasitology**, v. 29, n. 12, p. 1385-1394, 2009;

PAULA, V. S. O. Evaluation of aPCR based on primers to Nc5 gene for the detection of *Neospora caninum* in brain tissues of bovine aborted fetuses. **Veterinary Research Communications**, v.28, 2004.

PAYNE, S.; ELLIS, J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 347-351, 1996.

PENA, H. F. J. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo State, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 58-67, 2006.

PEREIRA-BUENO, J. *et al.* Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2, p. 143-152, 2003.

PEREIRA GARCIA-MELO, D. *et al.* Pathogenic characterization in mice of *Neospora caninum* isolates obtained from asymptomatic calves. **Parasitology**, v.137, n.7, p.1057-1068, 2010.

PETERS, M. *et al.* Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 1144-1148, 2001.

PETERSEN, E. *et al.* *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 2, p. 278-280, 1999.

RAGOZO, A. M. A. *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis Estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, p.33-37, 2003.

REICHEL, M.P. *et al.* What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – the billion dollar question, **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2012.

REMINGTON, J. S. *et al.* Toxoplasmosis. In: RemingtonJS, Klein J, editors. **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001. p. 205-346.

REMYINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTROYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 941-945, 2004.

REY, L.; REY, L. *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose. **Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e África**, 2001.

ROBERT-GANGNEUX, F.; KLEIN, F. Serologic screening for *Neospora caninum* France, **Emergence Infection Disease**, v. 15, n. 6, p. 987-988, 2009.

RODRIGUES, A. A. *et al.* Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.124, p.139-50, 2004.

ROSSI, G. F. *et al.* Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 252-259, 2011.

SAGER, H. *et al.* A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum* associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1, p. 1-15, 2001.

SAWADOGO, P. *et al.* Soroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 89-92, 2005.

SIKES, R. K. Toxoplasmosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.180, n.8, p.57-859, 1982.

SOUZA, A. E. S. *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma* em pacientes atendidos no Laboratório Celso Matos- Santarém, PA. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.34, n.1, p.51-52, 2002.

SPALDING, S. M. *et al.* Otimização da reação de polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e placenta de gestantes. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 2, 2002.

SPALDING, S. M. *et al.* Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, n.2, p.173-177, 2005.

STERKERS, Y. *et al.* Multicentric comparative analytical performance study for molecular detection of low amounts of *Toxoplasma gondii* from simulated specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3216-3222, 2010.

SUARÉZ-ARANDA, F. *et al.* The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. **Veterinary Parasitology**, v.91, p.23-32, 2000.

- TENTER A.M. Current knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*. **The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 23, n. 6, p. 391, 1999.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1217-1258, 2000.
- TRANAS, J.; HEINZEN, R.A.; WEISS, L.M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 5, p. 765-767, 1999.
- THURMOND, M.C.; HIETALA, S.K. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, p.1559-1562, 1996.
- UGGLA, A. *et al.* Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal for Parasitology**, v.28, p.1467-1472, 1998.
- YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 272-279, 1996.
- YU, J. *et al.* Seroepidemiology of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the People's Republic of China. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.79-85, 2007.

3 CAPÍTULO II - CONCORDÂNCIA NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Toxoplasma gondii* E ANTI- *Neospora caninum* NO SANGUE E NO LEITE BOVINO PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade da pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em amostras de leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e sua concordância com a detecção desses anticorpos em amostras de soro sanguíneo, simultaneamente coletadas das mesmas vacas. No total foram analisadas amostras correspondentes de soro sanguíneo e de leite de 177 vacas em início de lactação. Para o *T. gondii*, o diagnóstico no leite demonstrou concordância boa e sensibilidade baixa, quando comparado ao soro sanguíneo com título de anticorpos séricos ≥ 64 (ponto de corte). Quanto ao *N. caninum* obteve-se concordância excelente entre a detecção de anticorpos no soro sanguíneo com título ≥ 50 (considerado ponto de corte para termos de diagnóstico) e no leite com sensibilidade de 80,7% e especificidade de 100%, no entanto, para as vacas com títulos de anticorpos ≥ 100 no soro sanguíneo, a sensibilidade e a especificidade foram de 100%. Nas condições do presente estudo demonstrou-se que a RIFI não é indicada para diagnóstico da toxoplasmose em amostras de leite bovino, devido ao alto percentual de vacas soropositivas para anticorpos anti-*T. gondii* no soro sanguíneo diluído 1:64, em cujas amostras de leite não houve detecção desses anticorpos. Por outro lado, a RIFI é um teste viável para o diagnóstico da neosporose bovina, especialmente considerando como ponto de corte um título de anticorpos séricos ≥ 100 , podendo ser recomendável pela praticidade de coleta da amostra como parte de programas de saúde dos rebanhos e estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: RIFI; sorologia; neosporose; toxoplasmose; vacas leiteiras.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the applicability search for anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle milk samples by indirect fluorescent antibody test (IFAT), and their concordance with detection of the same antibodies in blood serum samples, simultaneously collected from the same cows. A total of 177 cows in the beginning of lactation provided corresponding samples of blood serum and milk. To *T. gondii*, milk diagnosis demonstrated good conformity and low sensitivity in comparison with blood samples whose serum antibody titer ranged ≥ 64 (cut-off point). As for *N. caninum* we obtained optimum conformity between the detection of blood serum antibodies, with titer ranging ≥ 50 (diagnose-aimed cut-off point) and milk, with sensitivity reaching 80.7% and 100% specificity. However, sensitivity and specificity reached 100% for cows whose antibodies titers in blood serum ranged ≥ 100 . We were able to demonstrate that IFAT is not indicated for diagnosing toxoplasmosis in cattle milk samples due to the high percentage of cows that showed seropositivity to anti-*T. gondii* antibodies at the 1:64 blood serum dilution, in whose blood samples there was no such antibody detection. On the other hand, IFAT is a feasible test for diagnosing cattle neosporosis, especially when cut-off point is a serum antibody titer ≥ 100 . It can be recommended as part of herd health programs and epidemiologic studies due to sampling practicality.

Key words: IFAT; serology; dairy cattle; neosporosis; toxoplasmosis.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii e *Neospora caninum* são parasitos intracelulares obrigatórios e podem acometer diversas espécies relevantes na produção de leite e seus derivados, como ovinos, caprinos, bovinos e bubalinos (DAGUER *et al.*, 2004; DUBEY e SCHARES, 2011). Ambos parasitas são importantes causas de problemas reprodutivos, isolados ou associados a outros agentes (DUBEY, SCHARES e ORTEGA-MORA, 2007). O impacto econômico global da neosporose bovina foi avaliado recentemente e o aborto é o principal fator de prejuízo ao produtor. Em 10 países avaliados, as perdas econômicas devido ao *N. caninum* na bovinocultura excedem um bilhão de dólares anuais (REICHEL *et al.*, 2012). No Brasil infecções por *T. gondii* trazem prejuízos tanto para a saúde pública quanto para o setor agropecuário. Há relatos de infecção por *T. gondii* em diversas espécies animais, inclusive aquelas que são utilizadas para consumo humano, podendo causar a toxoplasmose humana (DAGUER *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2009).

O diagnóstico da neosporose e toxoplasmose bovinas pode ser realizado pela detecção do parasita por histopatologia, imunohistoquímica ou por PCR, ou pela detecção de anticorpos contra o parasita por ensaio imunoenzimático (ELISA), soroaglutinação ou reação de imunofluorescência indireta (RIFI), sendo a RIFI considerada uma técnica específica e de referência para ambos os parasitas (REMINGTON *et al.*, 2004; DUBEY e SCHARES, 2011). A pesquisa de anticorpos em amostras de leite é um método utilizado na Europa para investigação, monitoramento e controle de doenças infecciosas em rebanhos bovinos. O estado sanitário do rebanho pode ser avaliado no leite em relação à brucelose, diarreia viral bovina (BVD) e *Leptospira hardjo* (MILNE *et al.*, 2006). A detecção de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras individuais de leite, pela técnica de ELISA, tem sido utilizada em alguns países desde 1999 (CHANLUN *et al.*, 2006; MILNE *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-WARLETA *et al.*, 2011). Por outro lado, a RIFI, embora seja considerada um teste padrão para diagnóstico sorológico de *Neospora* spp., é pouco estudado para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* no leite (OOI *et al.*, 2000; CAMILLO *et al.*, 2010).

No Brasil, há estudos avaliando a concordância entre a detecção de anticorpos anti-*N. caninum*, em amostras de soro sanguíneo e do leite individual de fêmeas bovinas, somente no Rio Grande do Sul (CAMILLO *et al.*, 2011). Em toxoplasmose, os relatos de detecção de anticorpos no leite são limitados, sendo relatados em ratas, cabras e ovelhas (VITOR *et al.*, 1991; COSTA e LANGONI, 2010). Em bovinos, no Brasil, não existem estudos que associem a ocorrência de anticorpos no soro sanguíneo e no leite para *T. gondii*. Os testes para detectar anticorpos anti-*T. gondii* e *N. caninum* no leite poderiam ser mais utilizados, porém, as informações a respeito do método da RIFI para este tipo de análise em bovinos são limitadas até o presente (COSTA e LANGONI, 2010; CAMILLO *et al.*, 2011). O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade da pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em amostras de leite bovino pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e sua concordância com a detecção desses anticorpos em amostras de soro sanguíneo, simultaneamente coletadas das mesmas vacas.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram coletadas 177 amostras simultâneas de sangue e de leite de vacas em fase inicial de lactação, procedentes de 10 propriedades rurais localizadas nas mesorregiões Centro-Sul (três), Oeste (cinco) e Sudoeste (duas) do estado do Paraná. As amostras de sangue foram coletadas por punção da veia coccígea e centrifugadas a 1000 xg por 10 min para obtenção do soro sanguíneo. As amostras de soro foram mantidas a -20 °C até as análises. As amostras de leite foram coletadas de maneira asséptica, em tubos de ensaio estéreis e obtidas de quartos sem mastite clínica. Os três primeiros jatos de leite foram desprezados e as amostras foram mantidas refrigeradas para transporte até o laboratório. O leite foi centrifugado a 1000 xg durante 20 minutos, a amostra para análise foi aspirada abaixo da camada de gordura e mantida a -20 °C até as análises (OOI *et al.*, 2000; CAMILLO *et al.*, 2011).

Cada amostra de soro sanguíneo foi dividida em duas alíquotas nas diluições iniciais de 1:64 e 1:50 (PBS, pH 7,2), destinadas para a RIFI contra *T. gondii* ou *N.*

caninum, respectivamente, as amostras de leite foram destinadas a RIFI sem serem diluídas. As amostras de soro sanguíneo que apresentaram reações positivas foram diluídas até a determinação do título máximo da reação (CAMILO *et al.*, 2011; MACEDO *et al.*, 2012). Foram utilizadas lâminas contendo taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH) ou *N. caninum* (cepa NC-1), obtidos através de cultura *in vitro* em células VERO, produzidos no Laboratório de Patologia Clínica da UFPR. Os taquizoítos foram diluídos para uma concentração de 500 a 1000 taquizoítos/ μ l de PBS e colocados em lâminas forradas com teflon contendo 12 poços de 5mm de diâmetro cada, as quais foram secas em estufa a 37°C e conservadas a -20°C até as análises. Amostras de soro sanguíneo de bovinos, positivas ou negativas, foram utilizadas como controle para a RIFI em todas as lâminas, assim como anticorpo secundário anti-IgG^{®a} bovino conjugado ao isotiocianato de fluoresceína na diluição de 1:100. As amostras com fluorescência periférica total do taquizoíto foram consideradas positivas (PARÉ *et al.*, 1995).

As amostras de soro sanguíneo e de leite foram testadas paralelamente. Os resultados da detecção de anticorpos nos diferentes fluidos testados foram comparados, utilizando-se o resultado da RIFI no soro sanguíneo como referência. Foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade e concordância (índice *kappa*) seguindo as recomendações da OPAS (1997). A sensibilidade e a especificidade da detecção de anticorpos pela RIFI no leite foram calculadas em comparação à detecção de anticorpos nas amostras de soro sanguíneo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de concordância, entre o título de anticorpos no sangue e no leite, pelo índice *kappa* para *T. gondii* e *N. caninum*, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

TABELA 1 - Comparação entre o título de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em amostras de soro sanguíneo e a detecção qualitativa de anticorpos em amostras de leite coletadas simultaneamente das mesmas vacas e avaliadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Títulos de anticorpos no soro sanguíneo	Nº de vacas positivas no soro sanguíneo/Nº total de amostras sanguíneas (%)	Nº de vacas positivas no leite/total de positivas no soro sanguíneo (%; κ^a)	Critério*
64	37/177 (20,9%)	19/37 (50,3%; 0,62)	Bom
256	17/177 (9,6%)	17/17 (100%; 1,00)	Excelente
1024	3/177 (1,7%)	3/3 (100%; 1,00)	Excelente

^a índice kappa (κ).

*Critério de classificação - concordância estatística em nível de 5%, entre os resultados avaliados, pelo índice kappa (ROSNER e WILLETT, 1988).

TABELA 2 - Comparação entre o título de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras de soro sanguíneo e a detecção qualitativa de anticorpos em amostras de leite coletadas simultaneamente das mesmas vacas e avaliadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Títulos de anticorpos no soro sanguíneo	Nº de vacas positivas no soro sanguíneo/Nº total de amostras sanguíneas (%)	Nº de vacas positivas no leite/total de positivas no soro sanguíneo (%; κ^a)	Critério*
50	83/177 (46,9%)	67/83 (80,7%; 0,82)	Excelente
100	63/177 (35,6%)	63/63 (100%; 1,00)	Excelente
200	21/177 (11,9%)	21/21 (100%; 1,00)	Excelente
400	12/177 (6,8%)	12/12 (100%; 1,00)	Excelente
800	9/177 (5,1%)	9/9 (100%; 1,00)	Excelente

^a índice kappa (κ).

*Critério de classificação - concordância estatística em nível de 5%, entre os resultados avaliados, pelo índice kappa (ROSNER e WILLETT, 1988).

Nas vacas que apresentaram título de anticorpos anti-*T. gondii* de 1:64 no soro sanguíneo, foi encontrada boa concordância (índice kappa 0,62) com sensibilidade de 51,3% e especificidade de 100% nas amostras de leite correspondentes. Nas amostras de soro sanguíneo, com título de anticorpos de 256 e 1024, obteve-se sensibilidade e especificidade de 100% e concordância excelente.

O total de vacas positivas para anticorpos contra *T. gondii* no soro sanguíneo diluído a 1:64 foi de 37, porém, 19 dessas vacas não tiveram anticorpos anti-*T. gondii* detectados no leite. O índice kappa demonstrou concordância boa e sensibilidade considerada baixa para a detecção comparativa de anticorpos contra *T. gondii* no soro sanguíneo e no leite nesta diluição. Estes resultados depõem contra a segurança do diagnóstico sorológico para *T. gondii* em amostras de leite bovino pela RIFI. Considerando que, em geral, preconizam-se diluições sorológicas com ponto de corte ≥ 64 (MARANA *et al.*, 1994; GARCIA *et al.*, 1999; DAGUER *et al.*, 2004), estes resultados discordantes são particularmente relevantes do ponto de vista diagnóstico, uma vez que 51,35% das vacas soropositivas para anticorpos contra *T. gondii*, na diluição de 1:64 do soro sanguíneo, seriam consideradas negativas pela RIFI utilizando amostras de leite, incorrendo-se em resultados falso-negativos quanto ao status sorológicos destes animais.

A utilização da RIFI para detecção de anticorpos contra o *T. gondii* no leite bovino e sua relação comparativa com amostras de soro sanguíneo são temas ainda pouco explorados em bovinos. Analisando os resultados das amostras de soro sanguíneo e de leite para o *T. gondii*, observou-se que a frequência de animais com anticorpos detectáveis no leite aumenta conforme o título no soro, possivelmente devido aos níveis de imunoglobulinas no leite serem influenciados pelo nível de anticorpos presentes no soro sanguíneo (HURLEY e THEIL, 2011).

As imunoglobulinas no leite são influenciadas pelos níveis de anticorpos no soro, mas também são produzidas no úbere, antes do parto, e o nível de IgG diminui rapidamente durante as duas primeiras semanas de lactação (CHANLUN *et al.* 2006; HURLEY e THEIL, 2011). Outros fatores que podem alterar o título de anticorpos no leite são: a fase da lactação; alta produção leiteira diária; ocorrência de inflamação da glândula mamária; número de lactações e o estresse (CHANLUN *et al.*, 2006). No presente estudo todas as amostras reagentes no leite foram provenientes de animais soro reagentes e o leite foi coletado de quartos que não apresentavam mastite clínica, o que indica possivelmente a ausência de reações falso-positivas no leite, que de acordo com KLINTEVALL e colaboradores (1991), poderiam ser causadas por mastite ou resíduos de gordura. Neste caso, a necessidade de identificar quartos mamários sem

indícios de mastite, para detecção de anticorpos pode ser um fator complicador para utilização do diagnóstico desses agentes a partir de amostras de leite, limitando a utilização do teste em animais com alterações inflamatórias da glândula mamária.

Foram detectados anticorpos contra *N. caninum* no soro sanguíneo diluído a 1:50 em 83/177 (46,9%) vacas. Destas 83 vacas soropositivas, 67 (80,7%) foram positivas também para amostras de leite, com concordância considerada excelente ($\kappa=0,82$), sensibilidade de 80,7% e especificidade de 100%. Os resultados obtidos foram superiores aos de CAMILLO *et al.* (2011), que em estudo similar obtiveram concordância de 0,40 no mesmo título. De acordo com CHRISTENSEN e GARDNER (2000) e CHANLUN *et al.* (2006) esta diferença entre concordâncias poderia ser justificada pelos contrastes de ecossistemas entre as regiões estudadas, o estágio de lactação, a amostragem ou a produção de leite diária, o que pode interferir no título de anticorpos contra *N. caninum* no leite.

Por sua vez, quando consideradas as amostras de soro sanguíneo com título de anticorpos ≥ 100 , obteve-se concordância excelente, sensibilidade e especificidade de 100% em relação às amostras de leite. Esses valores corroboram com aqueles obtidos por OOI *et al.* (2000), que utilizaram amostras de leite de vacas com título de anticorpos de 1:200 no soro sanguíneo e obtiveram concordância excelente para a RIFI no leite e no soro sanguíneo e também aos de CAMILLO *et al.* (2011), que demonstraram 100% de concordância entre a RIFI, no soro e no leite, para os animais com títulos de anticorpos séricos ≥ 100 .

Todas as amostras avaliadas para *N. caninum* que foram positivas no soro sanguíneo e negativas no leite (16/83; 19,3%) tinham titulação sérica de 50 ($\kappa=0,82$). A diluição de 1:50 no soro sanguíneo é utilizada como ponto de corte para diagnóstico de neosporose por vários autores (DUBEY *et al.*, 2011). Outros estudos realizados, que utilizaram a RIFI para detecção de anticorpos no leite comparativamente ao soro sanguíneo (OOI *et al.*, 2000; CAMILLO *et al.*, 2011) também verificaram concordância de 100% entre soro sanguíneo e leite somente em vacas com título de anticorpos séricos ≥ 100 , o que indica que o diagnóstico de neosporose pela RIFI no leite pode ser utilizado, mas com restrições, principalmente em vacas com títulos séricos de 50. No método de ELISA para diagnóstico de neosporose no leite, GONZÁLEZ-WARLETA *et*

al. (2011) encontraram resultados de concordância no leite e soro sanguíneo de 97,6%, da mesma forma, SCHARES e colaboradores (2005), analisando a adaptação de um ELISA comercial para testar amostras de soro de sangue e de leite, observaram uma excelente concordância entre os resultados das amostras pareadas. Estes resultados aliados aos do presente estudo demonstram a viabilidade da pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras individuais de leite, como alternativa para o diagnóstico de neosporose em rebanhos leiteiros.

CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo demonstrou-se que a RIFI não é indicada para diagnóstico da toxoplasmose em amostras de leite bovino, devido ao alto percentual de vacas soropositivas para anticorpos anti-*T. gondii* no soro sanguíneo diluído 1:64, em cujas amostras de leite não houve detecção desses anticorpos. Por outro lado, a RIFI é um teste viável para o diagnóstico da neosporose bovina, especialmente considerando como ponto de corte um título de anticorpos séricos ≥ 100 , podendo ser recomendável pela praticidade de coleta da amostra como parte de programas de saúde dos rebanhos e estudos epidemiológicos.

AGRADECIMENTO: Ao CNPq Edital Universal - Edital MCT/CNPq Nº 014/2011- pelo apoio financeiro.

FONTES DE AQUISIÇÃO: ^a- Anti-IgG bovina conjugada à fluoresceína (FITC): Affinity Purified Antibody Fluorescein (Sigma/F-7887), Sigma–Aldrich, USA.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA: Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da UFPR (protocolo nº 0054/2010).

REFERÊNCIAS

- CAMILLO, G. *et al.* Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos de leite do sudoeste do Paraná. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1511-1513, 2010.
- CAMILLO, G. *et al.* Detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* em amostras individuais e coletivas de leite de bovinos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p.482-486, 2011.
- CHANLUN, A. *et al.* Application of repeated bulk milk testing for identification of infection dynamics of *Neospora caninum* in Thai dairy herds. **Veterinary Parasitology**, v.136, p.243- 250, 2006.
- COSTA, V. M.; LANGONI, H. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected Wistar female rats. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 2, p.368-374, 2010.
- COSTA, G. H. N. *et al.* Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n.1, p. 61-66, 2009.
- DAGUER, H. *et al.* Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, 2004.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.
- DUBEY J.P.; SCHARES G. Neosporosis in animals: The last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1-2, p. 90-108, 2011.
- GARCIA, J.L. *et al.* Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e equinos e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v.29, n.1, p.91-97, 1999.

- GONZÁLEZ-WARLETA, M. *et al.* Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle, **Preventive Veterinary Medicine**, v. 101, n. 58–64, 2011.
- HURLEY, W. L.; THEIL, P. K. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. **Nutrients**, v. 3, n. 4, p. 442-474, 2011.
- KLINTEVALL, K. *et al.* Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukemia virus in milk and serum. **Journal of Virology Methods**, v. 33, p. 319–333, 1991.
- MACEDO, M. F. S. B. *et al.* Serum occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cows slaughtered in an abattoir for human consume, **Ciência Rural**, v. 42, n. 6, 2012.
- MARANA, E.R.M. *et al.* Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos de corte, abatidos em matadouros do norte do Paraná – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.15, n.1, p.38-40, 1994.
- MILNE E. *et al.* Associations between *Neospora caninum* specific antibodies in serum and milk in two dairy herds in Scotland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 77, p. 31-47, 2006.
- OOI, H. K. *et al.* Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 47-55, 2000.
- OPAS (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE). **Métodos de investigação epidemiológica em doenças transmissíveis**. Brasília, 1997. V.1, 116p.
- PARÉ J.; HIETALA S.K. e THURMOND M.C. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora sp.* infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, p. 273-275, 1995.
- REICHEL, M.P. *et al.* What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – the billion dollar question, **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 2, p. 133-142, 2012.
- REMYINGTON, S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 941-945, 2004.

ROSNER, B.; WILLETT, W. Interval estimates for correlation coefficients corrected for within-person variation: implications for study design and hypothesis testing. **American Journal of Epidemiology**, v. 127, p. 377-86, 1988.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, 2000.

VITOR, R.W. A. *et al.* Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, n.2, p. 147-154, 1991.

4 CAPÍTULO III - SORODIAGNÓSTICO E INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE *Neospora caninum* E *Toxoplasma gondii* EM SERES HUMANOS

RESUMO

No Brasil, especialmente no Paraná, os estudos sorológicos e moleculares para neosporose e toxoplasmose em pessoas são escassos, particularmente, em trabalhadores rurais e indivíduos imunodeprimidos. Em face da importância e da escassez de informações sobre estes parasitas em seres humanos no Paraná, objetivase no presente estudo investigar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação de polimerase em cadeia (PCR) em indivíduos do Estado do Paraná. Foram analisadas amostras sanguíneas de 123 pessoas distribuídas em dois grupos: 32 indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e 91 trabalhadores rurais não portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). As amostras de soro foram analisadas pela RIFI para detecção de anticorpos anti-*N. caninum* (1:50) e anti-*T. gondii* (1:16) Foi realizado diagnóstico molecular em capa leucocitária pela PCR convencional para o *N. caninum*, PCR convencional para *T. gondii* e PCR tempo real sistema *Taqman* para *T. gondii*. Foram detectados anticorpos anti-*N. caninum* em 31,2% dos indivíduos soropositivos para HIV. Não foram detectados anticorpos anti-*N. caninum* nas amostras de soro de trabalhadores rurais. Não foram identificados resultados positivos por PCR convencional para o *N. caninum*. Foram detectados anticorpos anti-*T. gondii*, pela RIFI, em 68,7% dos indivíduos soropositivos para o HIV e 40,7% dos trabalhadores rurais. Não foram identificados resultados positivos pela PCR (convencional e tempo real) para o *T. gondii*. Não há estudos de detecção molecular do *N. caninum*, pela PCR, em capa leucocitária proveniente de sangue periférico de pessoas, porém este estudo confirma que tanto o *N. caninum* quanto o *T. gondii* foram capazes de promover a infecção e soroconversão em indivíduos imunodeprimidos.

Palavras-chave: neosporose; toxoplasmose; pessoas; trabalhadores rurais; HIV; imunodeprimidos.

ABSTRACT

Brazilian serological and molecular studies on human neosporosis and toxoplasmosis are scarce, particularly when it comes to farm workers and immunocompromised individuals. Due to the importance and shortage of information on these parasites in human beings, we aimed at investigating the presence of anti-*N. caninum* and anti-*T. gondii* antibodies through indirect fluorescent antibody test (IFAT) and polymerase chain reaction (PCR) in individuals of the state of Parana. Our analysis consisted of 123 blood samples from the same number of people, assigned as follows: 32 HIV-carriers and 91 non-HIV-carrier farm workers. Serum samples were analyzed through IFAT to detect anti-*N. caninum* (1:50) and anti-*T. gondii* (1:16) antibodies. Molecular diagnosis through conventional PCR utilized buffy coat for *N. caninum* and *T. gondii*, and real-time PCR used the *Taqman* system for *T. gondii*. Anti-*N. caninum* antibodies were detected in 31.2% of HIV-seropositive individuals. Blood samples from farm workers did not show anti-*N. caninum* antibodies. Conventional PCR brought negative results for *N. caninum*. Anti-*T. gondii* antibodies were detected through IFAT in 68.7% of HIV-seropositive individuals and in 40.7% of farm workers. No positive results were identified through conventional and real-time PCR for *T. gondii*. Immunocompromised individuals showed seroconversion for *N. caninum* and *T. gondii*, whereas farm workers showed seroconversion for *T. gondii*. *Neospora caninum* and *T. gondii* were not detected through PCR in the buffy coat derived from peripheral blood of farm workers and HIV-carriers.

Keywords: neosporosis; toxoplasmosis; people; farm workers; HIV; immunocompromised.

4.1 INTRODUÇÃO

O *Neospora caninum* foi primeiramente reconhecido em 1984, em um cão da raça labrador com encefalomielite. Este animal estava infectado por um parasito coccídio formador de cistos, similar ao *Toxoplasma gondii*, mas sem reação sorológica (BJERKAS, MOHN e PRESTHUS, 1984). Até 1988, anteriormente à descrição de *N. caninum*, algumas infecções em animais eram diagnosticadas erroneamente como toxoplasmose, porém em 1988 Dubey e colaboradores descreveram pela primeira vez a morfologia do parasito e neste mesmo ano estes dois parasitos foram diferenciados ultraestruturalmente (BJERKAS e PRESTUS, 1988).

O *T. gondii*, parasita que causa zoonose de distribuição mundial, tem como hospedeiros o homem e outros animais de sangue quente. A infecção humana pode ocorrer após o nascimento, principalmente pelo consumo de carne crua/mal cozida contendo cistos teciduais, e por alimentos e água contaminada pelos oocistos (AMENDOEIRA *et al.*, 1999).

A toxoplasmose afeta, aproximadamente, dois milhões de pessoas em todo mundo (LINDSTÖN *et al.*, 2006). A prevalência de indivíduos soropositivos para toxoplasmose aumenta com a idade e difere dependendo dos padrões culturais da população, hábitos alimentares e procedência urbana ou rural. Em regiões tropicais ou subtropicais de clima úmido, a prevalência é mais elevada, pois este tipo de clima favorece a sobrevivência dos oocistos no meio ambiente (GUIMARÃES *et al.*, 1999; AMENDOEIRA *et al.*, 2003). O *T. gondii* é um dos agentes infecciosos causadores de doenças oportunistas mais frequentes em indivíduos imunocomprometidos (YAZAR *et al.*, 2004).

O diagnóstico de neosporose e toxoplasmose pode ser realizado por técnicas que revelam a presença do parasita, como histopatológico, imunohistoquímica e amplificação dos genes (PCR), ou por técnicas que evidenciam a presença de anticorpos, como métodos imunoenzimáticos (ELISA), soroaglutinação e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), sendo a RIFI considerada uma técnica específica e de referência para ambos os parasitas (DUBEY e SCHARES, 2011).

A presença de anticorpos contra *N. caninum* em população humana foi descrita inicialmente em 1999 na Califórnia. Foram analisadas amostras de soros humanos advindos de doadores de sangue, observando-se que, utilizando o teste de imunofluorescência indireta, 6,7% amostras foram positivas para anticorpos contra *N. caninum* (TRANAS *et al.*, 1999).

No Brasil, foram realizados quatro estudos avaliando a presença de anticorpos contra *N. caninum* em pessoas. Na Bahia foram detectados anticorpos em amostras de soros dos de mulheres que apresentavam ou não histórico de perda fetal, indivíduos normais e pacientes infectados com o vírus HIV (MAGALHÃES *et al.*, 2002), em Minas Gerais, em amostras de soro de pacientes imunocomprometidos (LOBATO *et al.*, 2006). Em trabalhadores rurais considerados “grupo de risco”, dois trabalhos brasileiros estão descritos na literatura, um realizado no estado do Mato Grosso e outro no estado de São Paulo (CASSOL *et al.*, 2005; BENETTI *et al.*, 2009).

Os autores consideraram também que as soropositividades para *N. caninum* e *T. gondii* estavam significativamente associadas nesses grupos de pacientes examinados (MAGALHÃES *et al.*, 2002; LOBATO *et al.*, 2006). Não há evidências que a infecção por *N. caninum* é zoonótica (DUBEY, 2003), porém estes relatos da soropositividade em humanos não permitem descartar a possibilidade de que a infecção por este parasita afete o homem (NAM, KANG e CHOI, 1998; TRANAS *et al.*, 1999).

A presença de anticorpos contra o *N. caninum* não evidencia uma infecção ativa, apenas que o indivíduo foi exposto ao agente, faz-se necessária a pesquisa através de técnicas que revelem o DNA do parasita em amostras clínicas e a mais utilizada para este fim é a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), nenhum trabalho neste sentido foi encontrado na literatura no que se refere à pesquisa molecular de *N. caninum* em amostras humanas no Brasil.

Das metodologias baseadas no diagnóstico molecular para detecção de protozooses, destacam-se a PCR pelo método convencional e a PCR em tempo real, que combinam altas sensibilidade e especificidade (COLOMBO *et al.*, 2005; ESPY *et al.*, 2006). Na pesquisa clínica de *T. gondii*, a comparação entre técnicas de diagnóstico é de suma importância, pois permite estabelecer qual método apresenta melhores resultados e melhorar o diagnóstico.

No Paraná existem relatos de ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em trabalhadores rurais, porém estes são escassos, limitando-se a trabalhos realizados na região norte e sudoeste do estado (GARCIA e NAVARRO, 1995; GARCIA *et al.*, 1999; DAGHER *et al.*, 2004; MILLAR *et al.*, 2007), havendo assim necessidade de ampliar os estudos neste tipo de indivíduos em outras regiões do estado, como a região oeste.

No Brasil, os estudos sorológicos para neosporose e toxoplasmose em pessoas são escassos, particularmente, em trabalhadores rurais e indivíduos imunodeprimidos, e considerando os fatores como importância da atividade pecuária no país, principalmente a bovinocultura leiteira e o convívio próximo de trabalhadores rurais com animais soropositivos, deveria ser realizado um inquérito diagnóstico em populações humanas.

Em face da importância e da escassez de informações sobre estes parasitas em seres humanos no Paraná, objetiva-se no presente estudo investigar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação de polimerase em cadeia (PCR) em trabalhadores rurais e indivíduos imunodeprimidos do Estado do Paraná.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP/PUCPR 5017/11. Após serem obtidas as autorizações formais, amostras de sangue foram colhidas de pessoas com idade superior a 18 anos. Foram analisadas amostras sanguíneas de 123 pessoas distribuídas em dois grupos:

(I) 32 indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) selecionados no Laboratório de Sorologia do Hospital Erasto Gaertner com o teste quimioluminescência (Johnson & Johnson Brasil Ltda.), no período de agosto de 2012 a agosto de 2013.

(II) 91 trabalhadores pecuaristas, pertencentes a 18 propriedades rurais de municípios da região Oeste do estado do Paraná, no período de agosto de 2012 a agosto de 2013.

A colheita de sangue foi realizada por venocentese cefálica, sob responsabilidade de um profissional da área da saúde. Foram coletados 10 mL de sangue da veia cefálica direita ou esquerda, divididos igualmente em tubos com anticoagulante (EDTA) e sem anticoagulante, devidamente identificados. Após a coleta os tubos sem anticoagulante foram mantidos em repouso em temperatura ambiente e protegidos da luz, para a retração do coágulo, após estes foram centrifugados para a obtenção do soro sanguíneo, armazenados em microtubos e mantidos a -20°C até a realização dos exames sorológicos. As amostras de sangue com EDTA foram processadas por centrifugação e separação da capa leucocitária. A capa foi transferida para um novo tubo e mantida a -20°C até a extração do DNA.

4.2.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti- *N. caninum* e *T. gondii*

As amostras de soro foram analisadas pela RIFI para detecção de anticorpos IgG anti-*N. caninum* (cepa NC-1) e *T. gondii* (cepa RH). Considerou-se como ponto de corte as diluições de 1:50 e 1:16 (PBS, pH 7,2), para *N. caninum* e *T. gondii*, respectivamente. A técnica de imunofluorescência indireta e as lâminas para RIFI foram preparadas de acordo com Locatelli-Dittrich (2002). Amostras de soro sanguíneo de

bovinos, sabidamente positivas ou negativas, foram utilizadas como controle em todas as lâminas. Os conjugados fluorescentes anti-IgG humano ou anti-IgG bovino foram utilizados na diluição de 1:100 (conjugado com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA[®]). As lâminas foram observadas em microscópio equipado para fluorescência (sistema de epi-iluminação) com objetiva de 40x. Foram consideradas positivas as reações fluorescentes em toda a periferia dos parasitos (FIGURA 1). Nas reações negativas, os parasitos presentes na lâmina não apresentaram fluorescência, ou esta ficou localizada em uma das extremidades, sendo caracterizada como “coloração polar” ou “reação apical”. As amostras com fluorescência periférica total do taquizoíto foram consideradas positivas (PARÉ *et al.*, 1995).

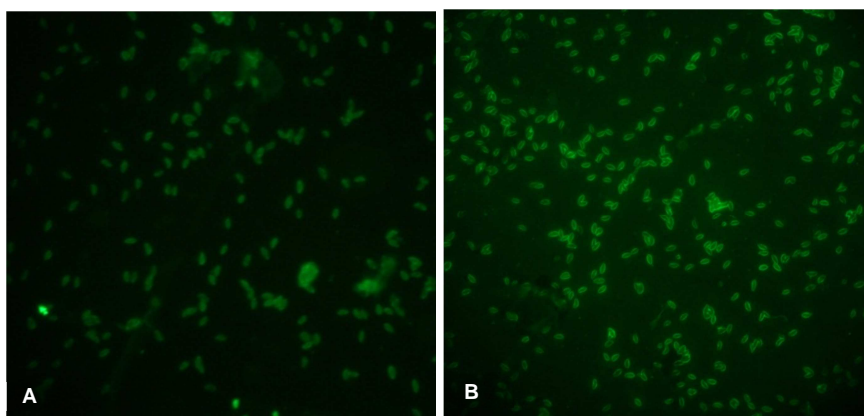


FIGURA 1 – A. RIFI soropositiva para *N. caninum* (1:50); B. RIFI soropositiva para *T. gondii* (1:16), taquizoítas observados em lâmina de imunofluorescência indireta, aumento de 400x.

4.2.2 Extração de DNA

A extração de DNA da capa leucocitária foi realizada utilizando-se o kit de Extração PureLink[®] Genomic DNA Kit da (Invitrogen[®]) de acordo com o protocolo do fabricante. O grau de pureza das extrações e a quantidade de DNA das amostras foram determinados por absorbâncias no equipamento Nanodrop (NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer), no comprimento de onda 260 e 280 nm (luz ultravioleta).

4.2.3 PCR convencional (cnPCR) para *N. caninum*

Todas as amostras foram submetidas à análise molecular através de PCR convencional. O alvo da PCR foram às sequências Nc5 do genoma do *N. caninum*, utilizaram-se os *primers* Np21 e Np6 (TABELA 1), cepa NC-1(YAMAGE *et al.*, 1996). As reações de amplificação foram realizadas para volume final de 25µL. Cada reação de cadeia de polimerase foi constituída de 1X de tampão de PCR (100 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM de KCl); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 60 ng da amostra de DNA; 1 U/µl da Taq DNA Polimerase Go Taq® Flexi DNA Polymerase (Promega), 0,5 pmol dos *primers* senso e antisenso; Água Mili-Q para completar um volume final de 25µL. O cultivo da cepa referência de *N. caninum* (NC-1) foi realizado *in vitro* (em células Vero), para a obtenção do sedimento parasitário e posterior extração do DNA, para obter o controle positivo. A água ultra-pura foi incluída como controle negativo durante a realização da cnPCR.

A amplificação foi realizada no termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler®, com o seguinte programa: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, 32 ciclos de 35 segundos a 94°C para desnaturação do DNA, 30 segundos a 54°C para anelamento dos *primers* ao DNA, 30 segundos a 74°C para extensão do DNA a partir dos *primers*, pela Taq polimerase. No final foi programado 1 ciclo de 5 minutos a 72°C para a extensão final e posterior manutenção a 4°C até a retirada das amostras.

TABELA 1 - Características dos iniciadores utilizados na PCR convencional para pesquisa de *N. caninum* e *T. gondii* e PCR *real time* para *T. gondii*.

Primer	Sequência (5' – 3')	Sentido	Tamanho	Posição
Np6^a	CAGTCAACCTACGTCTTCT	Antisenso	339pb.	758 – 776
Np21^a	GTGCGTCCAATCCTGTAAC	Senso	339pb.	449 – 467
Tox4^b	CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG	Senso	532pb.	Repetido 200 a 300x
Tox5^b	CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT	Antisenso	532pb.	Repetido 200 a 300x
B1_TG-TX2F^c	CTAGTATCGTGCGGCAATGTG	Senso	83 pb.	531–551
B1_TG-TX2R^c	GGCAGCGTCTCTTCCTCTTTT	Antisenso	83 pb.	571–592
B1_TG-TX2M1^c	(6-FAM) – CCACCTCGCCTCTTGG - (NFQ-MGB)	Sonda		552–567

^a PCR convencional *N. caninum*; ^b PCR convencional *T. gondii*; ^c PCR *real time* *T. gondii*; pb.: pares de bases.

4.2.4 PCR convencional (cnPCR) para *T. gondii*

Todas as amostras foram submetidas à análise molecular através de PCR convencional para *T. gondii*. Foram empregados os *primers* gênero específicos TOX4 e TOX5 (TABELA 1) que amplificam uma sequência repetitiva de 529 pb de uma região não-codificante (HOMAN *et al.*, 2000). Cada reação foi constituída de 1X de tampão de PCR (100 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM de KCl); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 60 ng da amostra de DNA; 1 U/μL da Taq DNA Polimerase Go Taq® Flexi DNA Polymerase (Promega), 0,5 pmol dos *primers* senso e antisenso; Água Mili-Q para completar um volume final de 25μL. Os cultivos dos parasitos isolados da cepa RH de *T. gondii* foram realizados *in vitro* (em células Vero) para obtenção do sedimento parasitário, extração de DNA e realização da PCR (ANEXO 2). A água ultra-pura foi incluída como controle negativo durante a realização da PCR.

A amplificação foi realizada no termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler®, com o seguinte programa: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, 32 ciclos de 35 segundos a 94°C para desnaturação do DNA, 30 segundos a 65°C para anelamento dos *primers* ao DNA, 30 segundos a 74°C para extensão do DNA a partir dos *primers*, pela Taq polimerase. No final foi programado 1 ciclo de 5 minutos a 72°C para a extensão final e posterior manutenção a 4°C até a retirada das amostras.

3.1.5 Visualização dos produtos da cnPCR

Os produtos foram aplicados em gel de agarose de alta resolução a 1,4%, corado com Safer Dye Kasvi[®], em cuba de eletroforese horizontal na voltagem de 95 volts, contendo TBE (Tris-borato 0,09M e EDTA 0,002M) como tampão de corrida. Com o auxílio de marcador de pares de bases (1Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen[®] 250µg (1,0 µg/µl). Os produtos amplificados (FIGURA 2) foram visualizados através de transiluminador ultravioleta (Loccus biotecnologia[®] LTB-20x20ST).

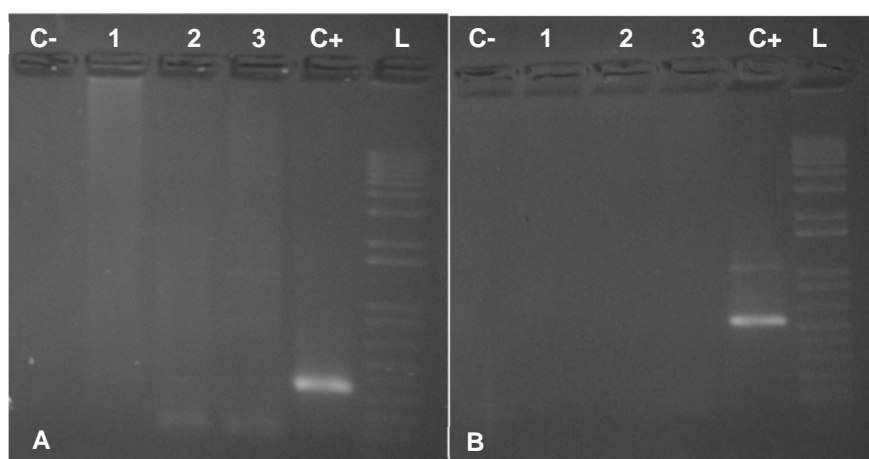


FIGURA 2 - Eletroforese em gel de agarose a 1,4% de produtos de amplificação por PCR de *N. caninum* (A) e *T. gondii* (B) em amostras de capa leucocitária humana. Marcador de pares de bases (L), Amostras negativas em A e B (1, 2 e 3), Controle positivo (C+) e Controle negativo (C).

4.2.5 Diagnóstico quantitativo molecular para *T. gondii* – PCR *real time* sistema Taqman® (qrtPCR)

Todas as amostras foram submetidas à análise molecular pelo PCR quantitativo *real time* sistema *Taqman*. Os dois marcadores desenhados e utilizados na qrtPCR foram desenvolvidos para hibridizarem-se com um fragmento do gene B1 (TABELA 1) e com a região repetitiva de 529 pb, 35 vezes repetitivo (KOMPALIC-CRISTO *et al.*, 2007). Os *primers* (iniciadores) e *probes* foram sintetizados através do *Primer Express™ software* pela *Applied Biosystems* (Foster City, CA, USA).

As concentrações dos reagentes foram estabelecidas para um volume final de 20µl, cada *mix* de reação conteve 10 µL TaqMan® Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems*); 1 µL do marcador com sua respectiva sonda (18 µM de cada *primer*, 5 µM da sonda TaqMan FAM dye labeled e 5 µM de *quencher NFQ*); 3 µL do DNA extraído/purificado e 6 µL de H₂O milli-Q autoclavada para completar volume final de 20 µL. Para cada reação foram adicionados dois controles positivos, a partir de DNA extraído de taquizoítas (concentração de 1×10^7 taquizoítas/mL e uma amostra clínica de paciente com toxoplasmose) e um controle negativo (água ultrapura autoclavada).

Inicialmente, incubou-se a reação a uma temperatura de 50°C por 2 minutos (a fim de otimizar a atividade da enzima AmpErase® Uracil-N-glycosylase (UNG), seguido por 95°C por 10 minutos. Em seguida realizou-se 40 ciclos compostos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7300 Real-Time PCR (*Applied Biosystems*) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo *Sequence Detection Software*, v1.3 (*Applied Biosystems*). As reações de qrtPCR foram previamente padronizadas pelo laboratório, utilizando DNA de *T. gondii* extraído de amostras de sangue sabidamente negativas para este parasita e misturadas com um número determinado de taquizoítas. Estas amostras diluídas permitiram estabelecer o real valor representativo da carga parasitária em cada amostra clínica.

4.2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística descritiva e procedeu-se a comparação entre médias.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As soroprevalências encontradas pela reação de imunofluorescência indireta (ponto de corte 1:50) e os resultados do diagnóstico da PCR método convencional para *N. caninum* estão apresentadas na TABELA 2. Foram detectados anticorpos anti-*N. caninum* em 31,2% (10/32) das amostras de pacientes soropositivos para HIV. Não foram detectados anticorpos contra *N. caninum* nas amostras de trabalhadores rurais.

TABELA 2 – Presença de anticorpos anti- *N. caninum* e análise molecular em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e trabalhadores rurais do Estado do Paraná.

GRUPOS	N° DE AMOSTRAS	<i>N. caninum</i>	<i>N. caninum</i>
		RIFI (1:50) +/%	PCR convencional +/%
HIV	32	10/31,2	0/0
RURAL	91	0/0	0/0

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; PCR: Reação em cadeia de polimerase; HIV: indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana; RURAL: trabalhadores rurais.

Para os indivíduos HIV positivos, foram encontrados 31,2% de soropositividade para o *N. caninum*, resultado similar ao relatado por Lobato *et al.* (2006), que detectaram em Minas gerais, anticorpos da classe IgG contra *N. caninum* em 38% de pacientes soropositivos para HIV.

Os resultados do presente estudo são superiores aos resultados de Magalhães *et al.* (2002) que detectaram na Bahia, 15% de soropositivos para *N. caninum* em indivíduos com AIDS. Segundo Lobato e colaboradores (2006) a taxa de soropositividade para *N. caninum* em pacientes imunocomprometidos pode estar relacionada à capacidade de resposta imune ao nível das mucosas desses indivíduos. As mucosas representam a interface entre o organismo e o meio que o cerca, muitas

vezes hostil, e os eventos imunológicos aí iniciados traduzem a fisiologia da operação do sistema imune, entretanto danos imunológicos causados em mucosas criam uma vulnerabilidade às doenças (VEAZEY *et al.*, 1998).

A pesquisa de anticorpos anti-*N. caninum* em trabalhadores rurais não obteve resultados positivos, estes dados corroboram com a pesquisa realizada por Cassol *et al.* (2005) no estado de São Paulo, na qual não foram detectados anticorpos anti-*N. caninum* nos indivíduos pesquisados. Na Inglaterra, em estudo com 518 trabalhadores rurais e com 3.232 pessoas não consideradas "grupo de risco", McCann *et al.* (2008) também não observaram soropositividade para *N. caninum* através da RIFI, embora tenham sido encontrados bovinos soropositivos na mesma localidade. Benetti *et al.* (2009) avaliaram a frequência de anticorpos anti-*N. caninum* em amostras de soros de trabalhadores rurais saudáveis do Estado de Mato Grosso e obtiveram soropositividade de 10,5% e Ibrahim *et al.* (2009), no Egito, avaliaram a soroprevalência de *N. caninum* em mulheres grávidas e obtiveram 7,94% de positividade. Os trabalhadores rurais amostrados no presente trabalho não tinham histórico de problemas reprodutivos e/ou de outras doenças concomitantes. Petersen *et al.* (1999) pesquisaram anticorpos anti-*N. caninum* em mulheres dinamarquesas com abortamentos repetidos, de causa desconhecida, e não encontraram resultado positivo. Sugeriram, então, que anticorpos devem ser investigados especificamente em mulheres com quadros reprodutivos aliados a sinais neurológicos.

Os resultados descritos no presente trabalho revelaram a presença de anticorpos anti-*N. caninum* apenas em pacientes infectados pelo HIV, e todos apresentaram soropositividade concomitante para *T. gondii*. O resultado sugere a capacidade de resposta do sistema imune para promover uma soroconversão para este parasito. Isto não ocorre na infecção pelo *T. gondii*, uma vez que este parasito pode levar à soroconversão tanto de indivíduos imunocompetentes como imunocomprometidos, e nestes últimos aparecem com maior frequência (LOBATO *et al.*, 2006).

Quanto à pesquisa molecular do *N. caninum*, não foram observados resultados positivos em nenhum dos grupos (TABELA 2). Este é o primeiro estudo realizado no Brasil, investigando a presença de *N. caninum* pela técnica de cnPCR, em amostras de papa leucocitária de pessoas. Para o *N. caninum* as amostras mais comumente

utilizadas em outras espécies, para realização de cnPCR são as teciduais (ANDREOTTI *et al.*, 2003; LOCATELLI-DITTRICH *et al.* 2004), tratando-se de pessoas este tipo de coleta torna-se muitas vezes inviável. Em seres humanos, o uso do cnPCR é mais comumente utilizado para amplificar fragmentos específicos de DNA a partir de fluidos corporais, tais como sangue (SPALDING, *et al.*, 2002), líquido amniótico (PELLOUX *et al.*, 1996), liquor (SUGANE *et al.*, 2001), humor aquoso (BLANC-JOUVAN *et al.*, 1996), fluido de lavado bronco-alveolar (ROTH *et al.*, 1992) e urina (FUENTES *et al.*, 1996). Para *N. caninum* a técnica de cnPCR realizada no presente estudo utilizou os *primers* Np6/Np21, com alta sensibilidade em diferentes estudos para detecção de DNA de *N. caninum* em fetos bovinos (YAMAGE *et al.*, 1996; LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2004).

As soroprevalências encontradas pela reação de imunofluorescência indireta (ponto de corte 1:16) e os resultados do diagnóstico da PCR método convencional e PCR em tempo real, realizadas para o *T. gondii* estão apresentadas na TABELA 3. Foram detectados anticorpos anti-*T. gondii* em 68,7% (22/32) das amostras de pacientes soropositivos para HIV e 40,7% (37/91) das amostras de trabalhadores rurais.

TABELA 3 – Presença de anticorpos anti-*T. gondii* e análise molecular em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e trabalhadores rurais do Estado do Paraná.

GRUPOS	N° DE AMOSTRAS	<i>T. gondii</i>	<i>T. gondii</i>	<i>T. gondii</i>
		RIFI (1:16) +/%	PCR convencional +/%	PCR real time +/%
HIV	32	22/68,7	0/0	0/0
RURAL	91	37/40,7	0/0	0/0

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta; PCR: Reação em cadeia de polimerase; HIV: indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana; RURAL: trabalhadores rurais.

Na população investigada, a soropositividade para o *T. gondii* foi de 40,7% para os trabalhadores rurais e 68,7% para os indivíduos HIV positivos e para trabalhadores rurais, estes resultados são concordantes aos encontrados na literatura. No Brasil, em humanos adultos, a prevalência de indivíduos reagentes para anticorpos anti-*T. gondii* varia de 30,34% a 97,10% (ISHIZUKA, 1978; ARAUJO *et al.*, 2000). Contudo, há localidades brasileiras que registram uma soroprevalência mais elevada. Entre estas, destaca-se a região sudoeste do estado do Mato Grosso com taxa de soroprevalência

de 97,41% (SANTOS *et al.*, 2009). Esta variabilidade de soroprevalência de anticorpos observados em estudos brasileiros pode estar relacionada, dentre outros fatores, aos diferentes pontos de corte utilizados e à ausência de técnicas sorológicas padronizadas.

Em relação ao diagnóstico molecular para detecção de *T. gondii*, não foram observados resultados positivos em nenhum dos grupos pesquisados (TABELA 3). A ausência destes protozoários no sangue dos indivíduos analisados, observado através da PCR, não pode ser considerada um resultado confirmatório, pois uma baixa quantidade de DNA do parasita poderia estar presente nas amostras e ser insuficiente para visualizar amplificação do DNA. Mesquita *et al.* (2010) sugerem que algumas amostras clínicas podem apresentar baixos níveis de parasitos e estar associadas a resultados falso-negativos. Além disso, segundo Ho-Yen *et al.* (1992) e Filice *et al.* (1993), a parasitemia em indivíduos imunocompetentes pode ser transitória ou intermitente. Isto pode acarretar um diagnóstico molecular negativo.

No presente estudo a pesquisa molecular do *T. gondii* no sangue periférico, foi realizada por dois métodos distintos de PCR, a qualitativa e a quantitativa, não houve amplificação do DNA do parasita segundo estes dois métodos (TABELA 3), estes resultados discordam das pesquisas realizadas com PCR em sangue periférico (KOMPALIC-CRISTO *et al.*, 2007), os resultados obtidos podem ser explicados com base na metodologia da PCR utilizada, pois esta é multifatorial e apresenta sensibilidade e especificidade variáveis, principalmente devido à falta de padronização técnicas (NAGY *et al.*, 2006, KAISER *et al.*, 2007, OKAY *et al.*, 2009). Esta observação também foi feita por outros autores e reportada na literatura como um problema na PCR para amplificação do fragmento B1 do *T. gondii* (CONTINI *et al.*, 2002; MONTOYA e LIESENFELD, 2004; CASSAING *et al.*, 2006).

Diversos pesquisadores têm adotado a cnPCR no diagnóstico laboratorial da toxoplasmose utilizando diferentes marcadores na detecção de *T. gondii*. Mais recentemente, o uso da qrtPCR possibilitou a quantificação da carga parasitária de *T. gondii* (COSTA *et al.*, 2000; SIMON *et al.* 2004, KOMPALIC-CRISTO *et al.*, 2007). Ainda que existam diversas sequências de marcadores para detecção de *T. gondii*, as mais utilizadas na cnPCR e qrtPCR têm como alvo o gene B1 por possuir uma região

que se repete 35 vezes no genoma deste parasita (BURG *et al.*, 1989; FILISETTI *et al.*, 2003; CHABBERT *et al.*, 2004; OKAY *et al.*, 2009). Na última década foi descrito outro alvo, trata-se de uma sequência de 529 pb que se encontra repetida de 200-300 vezes, e que vem sendo relatada por possuir uma sensibilidade que varia de 10 a 100 vezes maior do que a sequência do gene B1 (HOMAN *et al.*, 2000; CALDERARO *et al.*, 2006; EDVINSSON *et al.*, 2006). No entanto, alguns autores discordam desta maior sensibilidade do fragmento de 529 pb, pois ao compararem com o gene B1 não observaram qualquer diferença significativa entre os mesmos (FILISETTI *et al.*, 2003). Assim, os iniciadores propostos por Burg e colaboradores (1989) foram utilizados neste trabalho, procurando-se obter sensibilidade e especificidade como a descrita na literatura.

A escolha de qual tipo de material clínico deve-se extrair o DNA varia entre os laboratórios. Espy e colaboradores (2006) sugeriram que a camada leucocitária é o melhor espécime clínico para extração e diagnóstico de parasitoses. A PCR realizada em fluidos corporais como o sangue, representa uma alternativa pouco invasiva de diagnóstico da toxoplasmose (KOMPALIC-CRISTO *et al.*, 2007; WAHAB *et al.*, 2010). Um aspecto relevante da escolha do sangue é a capacidade de realizar o diagnóstico da doença na fase aguda através da detecção dos taquizoítas no sangue circulante, o que torna a PCR uma ferramenta para diagnóstico precoce, antes dos sinais clínicos, que nem sempre são aparentes (HO-YEN *et al.*, 1992; KOMPALIC-CRISTO, BRITTO e FERNANDES, 2005).

O modo de extração do DNA também pode interferir na sensibilidade da reação (ALFONSO *et al.*, 2009). No presente estudo, a extração de DNA aconteceu em amostras de papa leucocitária, processadas logo após a coleta e mantidas a -20°C até o momento da extração do DNA. Segundo Colombo *et al.* (2005) e Mesquita *et al.* (2010), para melhorar a sensibilidade da PCR em sangue periférico, as amostras de sangue devem ser processadas rapidamente (até 48 horas do momento da coleta) com o objetivo de prevenir a inibição da *Taq* polimerase.

Além da presença de inibidores da *Taq* polimerase, outros autores sugerem que os resultados falso-negativos podem ser explicados pela fase da coleta da amostra e a curta e intermitente parasitemia (SPALDING *et al.*, 2002; MONTOYA e LIESENFELD,

2004). A quantidade de amostra analisada pode influenciar o resultado do diagnóstico molecular. Quanto menor a amostra, menor a carga parasitária (MONTROYA *et al.*, 2009). Neste trabalho, uma única coleta de cada indivíduo foi analisada, um fator que pode ter contribuído para reduzir a possibilidade de detecção dos protozoários investigados. Alguns trabalhos associam a especificidade, sensibilidade e exatidão do diagnóstico ao tamanho e à condição das amostras biológicas estudadas.

Não há estudos de detecção molecular do *N. caninum*, pela PCR, em capa leucocitária proveniente de sangue periférico de pessoas, porém evidenciou-se que tanto o *N. caninum* quanto o *T. gondii* foram capazes de promover a infecção e soroconversão em indivíduos imunodrepimidos.

4.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

- Foram detectados anticorpos anti-*N. caninum* em indivíduos soropositivos para HIV com título de anticorpos séricos de 50 em 31,2% das amostras. Não foram detectados anticorpos contra *N. caninum* nas amostras de soro de trabalhadores rurais;
- Não foram identificados resultados positivos por PCR convencional para o *N. caninum*, no sangue de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e em trabalhadores rurais;
- Foram detectados anticorpos anti-*T. gondii*, pela RIFI, em 68,7% dos indivíduos soropositivos para HIV e em 40,7 dos trabalhadores rurais;
- Não foram identificados resultados positivos pela PCR convencional e PCR *real time* para o *T. gondii*, a partir de papa de leucócitos em amostras humanas.

REFERÊNCIAS

ALFONSO Y. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis. **Experimental Parasitology**, v. 122, p. 203-207, 2009.

AMENDOEIRA, M.R.R. *et al.* *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. **Revista Souza Marques**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.15-29, 1999.

AMENDOEIRA, M. R. R. *et al.* Inquérito sorológico para a infecção por *Toxoplasma gondii* em ameríndios isolados, Mato grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.6, p.671-676, 2003.

ANDREOTTI, R. *et al.* **Diagnóstico e Controle da Neosporose em Bovinos**. Embrapa Gado de Corte, 2003.

ARAÚJO, F. R. A. *et al.* Anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em estudantes de medicina veterinária de Campo Grande, MS, Brasil. **Ciência Rural**, v.30, n.6, 2000.

BENETTI, A. H. *et al.* Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, cães e trabalhadores rurais da região sudoeste do estado de mato grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. s1, p. 29-33, 2009.

BJERKÅS, I.; MOHN, S. F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. **Parasitology Research**, v. 70, n. 2, p. 271-274, 1984.

BLANC-JOUVAN, M. *et al.* Chorioretinitis following liver transplantation: detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 184-5, 1996.

BURG, J. L. *et al.* Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1787-92, 1989.

CALDEARO, A. *et al.* Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. **Acta Biomedica**, v. 77, n. 2, p. 75-80, 2006.

CASSOL, D.M.S. *et al.* Pesquisa de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em bovinos leiteiros, cães e humanos da região nordeste do Estado de São Paulo. **A Hora Veterinária**, v. 25, n. 145, 23-27, 2005.

CASSAING, S. *et al.* Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 720-724, 2006.

CHABBERT E.; LACHAUD L.; CROBU L. Comparison of two widely used pcr primer systems for detection of *Toxoplasma* in amniotic fluid, blood, and tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42; p 1719–1722, 2004.

COLOMBO, F.A. *et al.* Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5044-5047, 2005.

CONTINI, C. *et al.* Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 3, p. 275-283, 2005.

COSTA, J.M. *et al.* Real-time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2929-2932, 2000.

DAGUER, H. *et al.* Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1133-1137, 2004.

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2003.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals—The last five years. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 1, p. 90-108, 2011.

EDVINSSON, B; LAPPALAINEN, M; EVENGARD, B. Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 2, p.131-136, 2006.

ESPY, M.J. *et al.* Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, p.165–256, 2006.

FILICE, G. A. *et al.* Diagnosis of toxoplasma parasitemia in patients with AIDS, by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2327-31, 1993.

FILISSETTI, D. *et al.* Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Comparison of Targets for Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41; p. 4826- 4828, 2003.

FUENTES, I. *et al.* Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 10, p. 2368-71, 1996.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. Levantamento soroepidemiológico da toxoplasmose em moradores da zona rural do município de Guaraci - Paraná - Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.16, p.63-67, 1995.

GARCIA, J. L. *et al.* Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 01, p. 91-97, 1999.

GUIMARÃES, A. C. S. *et al.* Detecção de anticorpos IgG em pacientes com diferentes manifestações de toxoplasmose. **Revista Laes & Haes**, v.5, n.121, 1999.

HOMAN, W. L. *et al.* Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 69-75, 2000.

HO-YEN, D. O. *et al.* Use of the polymerase chain reaction to detect *Toxoplasma gondii* in human blood samples. **Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 10, p. 910-913, 1992.

IBRAHIM, H. M. *et al.* Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in northern Egypt. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 2, p. 263-267, 2009.

ISHIZUKA, M. M. Avaliação da frequência de reagentes ao *Toxoplasma gondii*, pela prova de imunofluorescência indireta, em suínos de matadouro do Município de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 15, n. 2, p. 151-153, 1978.

KAISER, B. K. *et al.* Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour associated NKG2D ligands. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 482-486, 2007.

KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C; FERNANDES, O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 4, p. 229-35, 2005.

KOMPALIC-CRISTO, A. *et al.* Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. **Parasitology Research**, v. 101, n. 3, p. 619-625, 2007.

LINDSTRÖM, I; *et al.* Prevalence of latent and reactivated *Toxoplasma gondii* parasites in HIV-patients from Uganda. **Acta Tropical**, v.100, p.218-222, 2006.

LOBATO, J. *et al.* Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 13, n. 1, p. 84-89, 2006.

LOCATELLI-DITTRICH, R. **Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em equinos no Estado do Paraná, Brasil.** Curitiba. 184 p. 2002. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

LOCATELLI-DITTRICH, R. *et al.* Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná, **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n. 3, p. 103-109, 2004.

MAGALHÃES, F.B. *et al.* Serologic evidences of human *Neospora caninum* infection in Brazil. In: Meeting of Brazilian Society of Immunology, Salvador. **Anais...** Salvador: Brazilian Society of Immunology, 2002, p. 114.

McCANN, C. M. *et al.* Lack of serologic evidence of *Neospora caninum* in humans, England. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 978-980, 2008.

MESQUITA, R.T.; VIDAL, J.E. PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers to determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. **Brazilian Journal of Infection Disease**, v. 14, p. 346-350, 2010.

MESQUITA, R. T. *et al.* Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 641-647, 2010.

MILLAR, P. R. *et al.* Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em trabalhadores de um matadouro de suínos e em indivíduos com outras atividades na cidade de Palmas, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, n.1, p.292-295, 2007.

MONTOYA, J.G.; LIESENFELD, O. **Toxoplasmosis**. Lancet 363: 1965-1976, 2004.

MONTOYA, A. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**, v. 160, p.159-162, 2009.

NAGY, B. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods. **Clinica Chimica Acta**, v.368, n.1-2, p.131-137, 2006.

NAM, H. W. *et al.* Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 36, n. 4, p. 269-275, 1998.

OKAY, T.S. *et al.* Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: analysis of 467 amniotic fluid samples. **Clinics**, v. 64; p. 171-176, 2009.

PARÉ, J.; HIETALA, S. K.; THURMOND, M. C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 3, p. 352-359, 1995.

PETERSEN, E. *et al.* *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 2, p. 278-280, 1999.

ROTH, A. *et al.* Application of the polymerase chain reaction in the diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in immunocompromised patients. **European Journal of Clinical Microbiology and Infection Disease**, v. 11, p. 1177-81, 1992.

SANTOS, T. R. *et al.* Prevalence of anti- *Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 3, p. 324-326, 2009.

SIMON, A. *et al.* Use of fluorescence resonance energy transfer hybridization probes to evaluate quantitative real-time PCR for diagnosis of ocular toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3681–3685, 2004.

SPALDING, S.M. *et al.* Otimização da reação de polimerase em cadeia para detecção de *Toxoplasma gondii* em sangue venoso e placenta de gestantes. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 2, 2002.

SUGANE, K. *et al.* Diagnosis of *Toxoplasma* meningoencephalitis in a non-AIDS patient using PCR. **Journal of Infection**, v. 42, n. 2, p. 159- 60, 2001.

TRANAS, J.; HEINZEN, R.A.; WEISS, L.M. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 5, p. 765-767, 1999.

VEAZEY, R.S. *et al.* Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. **Science**, v. 280, n. 5362, p. 427-431, 1998.

WAHAB, T. *et al.* Comparison of the AF146527 and B1 repeated elements, two real-time PCR targets used for detection of *Toxoplasma gondii*. **Clinical of Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 591-592, 2010.

YAZAR, S. *et al.* Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in patients with neoplasia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 1183-1186, 2004.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 272-279, 1996.

5 CAPÍTULO IV - FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFECÇÃO PELO *Toxoplasma gondii* EM TRABALHADORES RURAIS

RESUMO

Toxoplasmose é causada pelo protozoário parasito *Toxoplasma gondii*. Tal agente etiológico causa danos neurológicos graves quando ocorre por meio de infecção congênita ou na reativação da infecção em pessoas imunocomprometidas. Os estudos epidemiológicos têm identificado diferenças entre os fatores de risco, conforme os hábitos da população, e diferentes soroprevalências. O presente estudo avaliou a ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em trabalhadores rurais pertencentes a propriedades leiteiras da microrregião de Toledo, oeste do Paraná, e os fatores de risco associados à infecção. Foram coletadas amostras de sangue de 91 trabalhadores rurais e nas propriedades as pessoas foram submetidas ao questionário epidemiológico com os dados: sexo; consumo de carne bovina crua ou mal cozida, leite *in natura* bovino, embutidos artesanais, hortaliças cruas, água de poço, contato com felinos, contato com o solo. Os soros humanos foram submetidos à reação de imunofluorescência indireta para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* (ponto de corte $\geq 1:16$). As soropositividades dos indivíduos de acordo com a diluição foram: 40,6% (1:16), 22% (1:64); 12,1% (1:256) e 4,4% (1:1024). A soropositividade ao parasito foi elevada nos trabalhadores rurais, sendo de 17,6% em mulheres e 23,1% em homens. O consumo de leite *in natura* e realizar atividades em contato com o solo podem ser fontes de contaminação, sendo associadas com a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em trabalhadores rurais.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; pessoas; anticorpos; reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a parasitic disease *caused* by the protozoan *Toxoplasma gondii*. It causes serious neurological damage through vertically transmitted infections or through the reactivation of infections in immunocompromised patients. Epidemiological studies have identified differences among risk factors, which varied according to population habits and different seroprevalence. Our study has evaluated the incidence of anti-*T. gondii* antibodies in farm workers and risk factors associated with the infection. All individuals work for dairy products companies in Toledo and its outskirts, in western Parana. We collected blood samples from 91 farm workers, and applied an epidemiological questionnaire with the following data: gender; consumption of raw or rare beef, raw cow milk, processed meats, raw vegetables, well water, contact with felines, and contact with soil. Human sera were subjected to indirect immunofluorescence assay for the detection of anti-*T. gondii* antibodies (cut-off point $\geq 1:16$). Seropositivity, in all dilutions, came out as follows: 40.6% (1:16), 22% (1:64); 12.1% (1:256) and 4.4% (1:1024). Seropositivity to the parasite was found to be high in farm workers' samples, summing 17.6% in women and 23.1% in men. Raw milk consumption and tasks that require contact with the soil were evidenced to be contamination sources, since they were strongly associated with the detection of anti-*T. gondii* antibodies in farm workers.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; people; antibodies; indirect immunofluorescence assay (IFA).

5.1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose, doença causada pelo parasito intracelular *Toxoplasma gondii*, é uma zoonose comum entre os vertebrados, como aves e mamíferos, inclusive o homem, sendo os felídeos os hospedeiros definitivos (TENTER, 1999). O parasito tem ampla distribuição mundial e elevada prevalência sorológica, podendo atingir, aproximadamente, 60% da população de um mesmo país (DUBEY, 2004; KIM e WEISS, 2004). Estudos realizados no Brasil demonstraram que a soroprevalência da toxoplasmose na população em geral varia de 26% a 80% (DUBEY e BEATTIE, 1988; TENTER, HECKCROTH e WEISS, 2000; MAIA, *et al.*, 2012; BORGUEZAN, *et al.* 2014).

A transmissão horizontal ocorre via ingestão de oocistos presentes no ambiente, quando ingeridos acidentalmente pelo manuseio da terra ou pela água, e os cistos teciduais, presentes na carne de diferentes animais e utilizada para consumo humano. O hábito de ingerir carnes e produtos de origem animal, crus ou mal cozidos, tem grande importância na epidemiologia da toxoplasmose (TENTER, HECKCROTH e WEISS, 2000; BOOTHROYD e GRIGG, 2002; REZENDE-FIGUEIREDO *et al.*, 2010). A transmissão também pode ocorrer por taquizoítas presentes no sangue de bolsas de transfusão sanguínea, órgãos (transplantes de órgãos) ou leite não pasteurizado (DUBEY e BEATTIE, 1988; DUBEY, 2004).

É importante conhecer a via de transmissão mais importante, para o planejamento das ações educativas que visam reduzir a exposição ao parasito. A infecção humana, geralmente assintomática, pode ocorrer na forma subclínica ou oligossintomática em indivíduos imunocompetentes. Entretanto, em alguns casos, leva a um quadro clínico grave, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, nos quais aparece entre as principais infecções oportunistas, com altos índices de morbidade e mortalidade (DIAS e FREIRE, 2005).

Como os sintomas da toxoplasmose não são característicos, é necessária a realização de diagnóstico específico. O diagnóstico de rotina é baseado na resposta imune dos pacientes, por meio de testes imunológicos para detecção de anticorpos séricos específicos para *T. gondii*, principalmente das classes IgG e IgM. A sorologia é

utilizada no diagnóstico e nos estudos epidemiológicos (GARCIA *et al.*, 1999; FONTOURA e BECK, 2011).

A pesquisa do *T. gondii* em indivíduos cuja ocupação os coloca em contato direto com animais de produção soropositivos, é de grande importância, uma vez que diversos trabalhos vêm relatando a presença desse parasita em animais de produção (GARCIA *et al.*, 1999; TENTER *et al.*, 2000; DAGUER *et al.*, 2004; ALVARADO-ESQUIVEL *et al.*, 2011). O risco ocupacional ao qual estão expostos esses indivíduos deve ser levado em consideração, mostrando, com isso, a necessidade de um planejamento de saúde animal na origem da cadeia de produção, e da conscientização dos produtores para as formas de controle desta enfermidade (práticas de manejo adequadas, educação sanitária), para que possam, com isso, transformar seu produto em um fator positivo para a saúde animal e pública.

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de anticorpos anti- *T. gondii* em trabalhadores rurais pertencentes a propriedades leiteiras da microrregião de Toledo, Oeste do Paraná e identificar os fatores de risco associados à infecção.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP/PUCPR 5017/11. Foram coletadas amostras de sangue de 91 pecuaristas (com idade superior a 18 anos), pertencentes a propriedades leiteiras da microrregião de Toledo, Oeste do Paraná (24° 42' 49" Sul, 53° 44' 35" Oeste), esta região destaca-se por possuir pequenas propriedades produtoras de leite. Todas as propriedades apresentavam ordenha canalizada ou tipo balde ao pé e a maioria possuía mão-de-obra basicamente familiar.

O delineamento desta pesquisa foi realizado de forma que se obteve um estudo observacional, transversal e descritivo. Esse delineamento se caracteriza pela observação direta das variáveis de estudo em uma única oportunidade e sua análise considera que todas as observações foram feitas no mesmo instante, ignorando o espaço de tempo decorrido para a coleta dos dados do primeiro ao último indivíduo.

A coleta de sangue foi realizada por venocentese cefálica, sob-responsabilidade de um profissional da Área da Saúde. Além das coletas de sangue foi aplicado questionário epidemiológico estruturado, elaborado para se obter informações dos entrevistados sobre parâmetros e fatores de risco associados à presença de anticorpos anti-*T. gondii*. Estes questionários abordaram questões relacionadas ao: sexo; contato com bovinos soropositivos; consumo de carne bovina crua ou mal cozida; consumo de leite *in natura* bovino; consumo de hortaliças cruas; contato com felinos; consumo de embutidos artesanais; se realiza atividades ligadas ao solo; consumo de água de poço.

Foram coletados 5,0 mL de sangue da veia cefálica direita ou esquerda, utilizando agulhas descartáveis (07 x 25 mm), acopladas em tubos BD Vacutainer® sem anticoagulante, devidamente identificados. Após a coleta, os tubos foram mantidos em repouso em temperatura ambiente e protegidos da luz, para a retração do coágulo e obtenção do soro sanguíneo por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. As amostras de soro foram transferidas para microtubos de polipropileno (tipo Eppendorf®), previamente identificados. As amostras de soro foram submetidas a RIFI para detecção de anticorpos anti-*T. gondii* da classe imunoglobulina G (IgG), diluição inicial de 1:16, as amostras soropositivas foram diluídas até a determinação do título máximo da reação

conforme técnica padronizada descrita por Camargo (1964). Amostras de soro sanguíneo de bovinos, positivas e negativas, foram utilizadas como controle em todas as lâminas. Os conjugados fluorescentes anti-IgG humano ou anti-IgG bovino foram utilizados na diluição de 1:100 (conjugado com isotiocianato de fluoresceína - SIGMA®).

As lâminas foram observadas em microscópio de imunofluorescência equipado para fluorescência (sistema de epi-iluminação) com objetiva de 40x. Foram consideradas positivas as reações fluorescentes em toda a periferia dos parasitos. Nas reações negativas, os parasitos presentes na lâmina não apresentaram fluorescência, ou esta ficou apenas localizada em uma das extremidades dos mesmos, sendo caracterizada como “coloração polar” ou “reação apical”. Os resultados dos exames sorológicos foram enviados aos pacientes pelo profissional da área da saúde, sendo repassadas as orientações quanto aos resultados e procedimentos a serem adotados.

Análise estatística

A análise univariada de associação entre os grupos foi testada pelo teste de qui-quadrado (χ^2) com significância estatística se $P \leq 0,05$. A magnitude da associação dos riscos foi determinada pela razão de probabilidade de ocorrência (*odds ratio*, *OR*) e a significância foi determinada para um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%.

Considerou-se para análise estatística a variável dependente presença de anticorpos anti-*T. gondii* e as variáveis independentes: sexo; contato com bovinos soropositivos; consumo de carne bovina crua ou mal cozida; consumo de leite *in natura* bovino; consumo de hortaliças cruas; contato com felinos; consumo de embutidos artesanais; se realiza atividades ligadas ao solo; consumo de água de poço.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frequências dos títulos dos soropositivos ao *T. gondii* foram: 40,6% (16), 22% (64), 12,1% (256), 4,4% (1024). No presente estudo a soropositividade para os trabalhadores rurais pertencentes a propriedades bovino leiteiras foi de 40,6% (ponto de corte $\geq 1:16$) (TABELA 1), inferior a relatada por Garcia e Navarro (1995), de 71,3%, em trabalhadores da zona rural de Guaraci, microrregião de Londrina, também no Estado do Paraná. Essa diferença poderia ser explicada pela diferença na procedência das amostras analisadas, porque em Guaraci os exames foram realizados em pacientes provenientes da zona rural que procuraram o serviço de saúde local (postos de saúde).

TABELA 1 – Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* (RIFI-IgG) em trabalhadores rurais da microrregião de Toledo, Paraná, Brasil, 2014.

TÍTULO	REAGENTES		NÃO REAGENTES	
	N/TOTAL	%	N/TOTAL	%
1:16	37/91	40,6	54/91	59,3
1:64	20/91	22,0	71/91	78,0
1:256	11/91	12,1	80/91	87,9
1:1024	4/91	4,4	87/91	95,6

N: número de amostras; RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta.

A infecção pelo *T. gondii* depende de condições climáticas e, consequentemente, varia de uma área para outra (SPALDING *et al.*, 2005). No Brasil, a prevalência da infecção pelo *T. gondii* em humanos é de 40 a 80% (CANTOS *et al.*, 2000; AMENDOEIRA *et al.*, 2003). Nesta pesquisa, na maioria dos indivíduos com anticorpos específicos anti-*T. gondii* da classe IgG, verificou-se títulos baixos (1:16 e 1:64). Estes dados estão de acordo com os descritos por Souza (1995) e Daguer *et al.* (2004), que também encontraram baixos títulos em magarefes.

Os resultados da análise de associação da ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* com os fatores de risco estudados encontram-se na TABELA 2.

TABELA 2 – Fatores associados ao risco de trabalhadores rurais sororreagentes e não sororreagentes para *T. gondii* (ponto de corte $\geq 1:16$), indivíduos procedentes da microrregião de Toledo, Paraná, Brasil, 2014.

FATOR DE RISCO	REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA		ANÁLISE UNIVARIADA		
	Reagente %(n)	Não reagente %(n)	OR (tendência)	χ^2	P
Sexo					
Feminino	17,6(16)	26,4(24)	0,95	0,01	P=0,58
Masculino	23,1(21)	32,9(30)			
Contato com bovinos soropositivos					
Sim	16,5(15)	29,8(27)	1,54	0,51	P=0,37
Não	14,3(13)	39,6(36)			
Carne crua/mal cozida					
Sim	26,4(24)	41,7(38)	0,78	0,10	P=0,65
Não	14,3(13)	17,6(16)			
Leite <i>in natura</i> bovino^a					
Sim	31,9(29)	30,8(28)	3,37	5,52	P=0,01^a
Não	8,8(8)	28,6(26)			
Hortaliças cruas					
Sim	36,3(33)	52,7(48)	1,03	0,09	P= 0,96
Não	4,4(4)	6,6(6)			
Contato com felinos					
Sim	13,2(12)	29,7(27)	0,48	2,10	P= 0,10
Não	27,5(25)	29,7(27)			
Consumo de embutidos					
Sim	32,9(30)	42,9(40)	1,50	0,28	P =0,43
Não	7,7(7)	15,3(14)			
Realiza atividades^a ligadas ao solo					
Sim	32,9(30)	32,9(30)	3,43	5,28	P=0,01^a
Não	7,7(7)	26,3(24)			
Consome água de poço					
Sim	35,2(32)	41,7(38)	2,69	2,37	P =0,08
Não	5,5(5)	17,6(16)			

χ^2 =valor de qui-quadrado com correção de Pearson ($\leq 0,05$); P=valor de P; OR=odds ratio; ^a diferença significativa

Na variável sexo não foram observadas diferenças significativas entre os indivíduos examinados, conforme observados por outros autores em indivíduos procedentes do estado Paraná (GARCIA e NAVARRO, 1995; GARCIA *et al.*, 1999; LIMA, 2008), e do Espírito Santo (BUERY, 2013). No presente estudo, os trabalhadores desenvolviam praticamente o mesmo tipo de atividade, bem como estavam igualmente expostos às outras variáveis, independentemente do sexo, o que sugere que esses indivíduos provavelmente, tinham contato com fatores de exposição na mesma intensidade e frequência. Desse modo, as eventuais diferenças observadas ocorreriam

ao acaso, uma vez que o sexo não é fator de resistência ou susceptibilidade à infecção segundo Amendoeira *et al.* (2003).

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre a proporção de indivíduos que possuem contato com bovinos soropositivos e os que não possuem. Este resultado concorda com GARCIA e colaboradores (1999), o referido autor também não encontrou correlação significativa entre humanos e bovinos, dados que se assemelham aos observados neste trabalho.

Dentre os 91 indivíduos participantes desta pesquisa, 62 (68,1%) relataram, nas fichas epidemiológicas, que ingeriam carne crua ou mal cozida. Entretanto, uma interpretação mais cautelosa desta variável, no presente estudo, evidencia que dentre os indivíduos pesquisados que têm o hábito de ingerir carne crua ou mal cozida, apresentaram soropositividade de 26,4% ante 14,3% daqueles que não ingerem, revelando a influência da alimentação na ocorrência de anticorpos contra *T. gondi*. Embora o risco de adquirir a infecção, por meio desta via, tenha sido relatado por diversos autores (NAVARRO *et al.*, 1992, AMENDOEIRA, 1995; CHOI *et al.*, 1997; BARIL *et al.*, 1999; LIMA, 2008), no presente estudo não foi constatado um resultado estatisticamente significativo com relação a esta variável.

Estes resultados discordam dos obtidos por Spalding *et al.* (2005), no sul do Brasil, que encontraram uma alta razão de prevalência, sugerindo que este fator devem estar envolvido na transmissão da toxoplasmose na região. O hábito de ingerir carne crua ou mal cozida, principalmente de suíno, ovino ou caprino (REMINGTON *et al.*, 1995; TENTER *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 2006) é de extrema relevância em se tratando da toxoplasmose, pois são os animais mais suscetíveis à formação de cistos teciduais.

A infecção por *T. gondii* pode ocorrer concomitante à ingestão de alimentos crus ou mal cozidos (DUBEY e BEATTIE, 1988). COOK e colaboradores relataram num estudo tipo caso-controle realizado em seis países europeus, que entre 30% a 63% das infecções pelo *T. gondii* foram atribuídas ao consumo de carne crua ou mal cozidas, representando o principal fator de risco para a infecção em todos os centros estudados (COOK *et al.*, 2000). Porém, mesmo que a incidência de infecção à partir da carne seja

baixa, a frequência e a forma como é consumida proporcionam o grau de exposição e risco à infecção toxoplásmica (FRENKEL e DUBEY, 1972).

No presente estudo, o consumo de leite *in natura* bovino influenciou a sororreatividade ao parasito, com diferença estatística, este resultado corrobora com os obtidos por LIMA (2008), que realizou um inquérito soroepidemiológico para a ocorrência de toxoplasmose em estudantes universitários também na região oeste do Paraná. O risco de infecção por *T. gondii* por consumo de leite cru é considerado como pequeno por alguns autores (DUBEY e BEATTIE, 1988), mas pode ser também com leite pasteurizado ou fervido contaminado pelo protozoário. Este perigo aumenta quando há ingestão de leite de cabra não fervido (CHIARI e NEVES, 1984). O hábito de ingestão de leite de cabra não foi relatado entre a população estudada. Até o presente, a transmissão toxoplásmica pelo leite *in natura* foi descrita como possível na espécie caprina, e a carne e o leite não podem ser descartados como potenciais reservatórios da infecção na epidemiologia da doença (ESTEBAN-REDONDO e INNES, 1997). Esta hipótese foi confirmada por HIRAMOTO e colaboradores (2001), estes autores demonstraram experimentalmente que os cistos de *T. gondii* podem sobreviver no leite fresco ou queijo não pasteurizado ou inadequadamente tratado, e que estes podem ser considerados uma fonte potencial de *T. gondii* na transmissão, especialmente em áreas rurais, onde não há pasteurização.

A ingestão de hortaliças cruas não foi estatisticamente significativa e 29% dos indivíduos sororreagentes consomem hortaliças cruas. É importante lavar bem as frutas e legumes, porque podem estar sujas de terra contaminada, evitar contato com gatos ou com o solo ou, pelo menos, usar luvas apropriadas durante a jardinagem e ao manusear materiais potencialmente contaminados com fezes de gatos (AMENDOEIRA e CAMILLO-COURA, 2010). De acordo com alguns autores, a toxoplasmose pode ser adquirida por ingestão de oocistos esporulados presentes em hortaliças e frutas, ou pelas mãos que mantêm contato com o solo, areia, latas de lixo, quintais e jardins, onde possivelmente os felídeos defecaram (SOUZA *et al.*, 1987; DIAS e FREIRE, 2005).

Em Minas Gerais, uma avaliação de pessoas residentes em área urbana, em contato com animais na residência e no peridomicílio, revelou uma soroprevalência maior entre indivíduos em contato com gatos, galinhas e suínos. Outras variáveis

(presença de cães, cabras ou roedores e consumo de carnes, ovos ou leite cru ou fervido) não apresentaram associação na distribuição dos sororreagentes (CAMARGO *et al.*, 1995).

Não houve associação significativa ($P \leq 0,05$) entre a soropositividade para *T. gondii* e a presença de gatos, entretanto a presença de felinos e o contato próximo com esta espécie são importantes na epidemiologia da toxoplasmose. Este resultado concorda com os observados por Daguer *et al.* (2004), que encontraram positividade maior entre os indivíduos que não possuíam contato com gatos (90%) do que entre os que possuíam contato com esses animais (75%). Spalding *et al.* (2005) observaram, em seu estudo, que o contato com gatos apresentou maior influência como fator de exposição à infecção na área urbana, onde há um convívio mais estreito dos indivíduos com seus animais domésticos.

Segundo Navarro (1992) e Silva *et al.* (2010), um mecanismo de transmissão importante do *T. gondii* seria a ingestão de linguças preparadas de carne suína, costume alimentar de algumas regiões do interior do Brasil. No entanto, quando correlacionado o hábito da ingestão de embutidos pelos indivíduos, do presente trabalho, com a soropositividade ao *T. gondii*, não foi observada diferença estatisticamente significativa.

No presente estudo, a manipulação do solo foi um fator relacionado à infecção pelo *T. gondii*. Diversos autores relatam que a contaminação do solo com oocisto de *T. gondii* está entre os principais fatores de risco para a infecção (ALVARADO-ESQUIVEL *et al.*, 2006; LAFFERTY, 2006; CARRUTHERS e SUZUK, 2007; HEUKELBACH *et al.*, 2007). O solo e areia contaminados com fezes de felídeos contendo oocistos esporulados representam também duradouras fontes de infecção do *T. gondii* (FRENKEL, 2004).

Alguns estudos têm relatado a importância da contaminação pelos oocistos em indivíduos que exercem atividades ou manipulam o solo. Em estudo realizado no sul do Brasil por Spalding *et al.* (2005) o solo foi o maior fator associado à infecção. Em Tawain, Lin e colaboradores (2008) investigaram os fatores relacionados à infecção pelo *T. gondii* em gestantes e demonstraram também que o contato com o solo foi um fator de forte associação com a soroprevalência para o *T. gondii*. Oliveira *et al.* (2004)

relataram que os poucos hábitos de higiene, principalmente nas crianças, podem levar a uma maior exposição à infecção pelos agentes transmitidos através da água ou alimentos.

A contaminação da água de abastecimento dos domicílios pelas fezes de felídeos constitui um fator que deve ser levado em consideração (AMENDOEIRA, 1995). Ao contrário do que a literatura afirma, o consumo de água de poço não tratada não foi fator de risco significativo nesta pesquisa. Entretanto Dubey *et al.* (2004), relataram um surto de toxoplasmose em Santa Isabel do Ivaí, Paraná/Brasil, a água foi associada ao surto em que ocorreu infecção aguda na população. No Canadá a epidemiologia da toxoplasmose foi associada à água de bebida e a população estudada desenvolveu a forma clínica da infecção (ISAAC-RENTON *et al.*, 1998).

Pesquisas soropidemiológicas detectaram como um dos principais fatores associados à soropositividade humana para anticorpos anti-*T. gondii* a ingestão de água por fontes não tratadas (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003; DE MOURA *et al.*, 2006). De acordo com Sroka *et al.* (2006) fontes de água que não recebem tratamento ou não são filtradas, podem constituir sério risco a contaminação pelo *T. gondii*, pois pode ocorrer consumo de água contaminada com oocistos do parasito.

O presente estudo fornece dados da ocorrência de indivíduos soropositivos para *T. gondii* no oeste do Paraná e os fatores de risco associados com a infecção. Deve-se ressaltar o consumo de leite *in natura* e o contato com o solo como possíveis riscos à doença, sendo necessário intensificar a ação dos agentes de saúde na orientação dos produtores rurais quanto às medidas de higiene e a importância do consumo de leite fervido para a prevenção da toxoplasmose.

5.4 CONCLUSÕES

O presente estudo indica elevada ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* entre os trabalhadores rurais pertencentes a propriedades bovino leiteiras da região oeste do Estado do Paraná. Quanto à análise dos fatores de risco predisponentes, destaca-se que:

- Foram encontrados altos títulos de anticorpos anti-*T. gondii* em 4,4% (1024) dos indivíduos amostrados;
- Houve associação estatística significativa ($P \leq 0,05$) para o consumo de leite *in natura* bovino e realizar atividades ligadas ao solo;
- A associação dos riscos relacionados à detecção de anticorpos anti-*T. gondii* como sexo, consumo de carne crua ou mal cozida, consumo de hortaliças cruas, contato direto com felinos, consumo de embutidos e consumo de água de poço, não influenciaram na distribuição dos sororreagentes ($P \geq 0,05$).

REFERÊNCIAS

- ALVARADO-ESQUIVEL, C. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection and liver disease: a case-control study in a Northern Mexican population. **Parasitology Vectors**, v. 4, n. 1, p. 75, 2011.
- AMENDOEIRA, M. R. R. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. **Anais da Academia Nacional de Medicina**, v. 155, n. 4, p. 224-5, 1995.
- AMENDOEIRA, M. R. R. *et al.* Inquérito sorológico para a infecção por *Toxoplasma gondii* em ameríndios isolados, Mato grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.6, p.671-676, 2003.
- AMENDOEIRA, M. R. R; CAMILLO-COURA, L. F. Uma breve revisão sobre toxoplasmose na gestação. **Scientia Medica**, v. 20, n. 1, 2010.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *et al.* Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 55, 2003.
- BARIL, L. *et al.* Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 31, n. 3, p. 305-309, 1999.
- ;
- BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 438-442, 2002.
- BORGUEZAN, C. *et al.* Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em indígenas da etnia Terena, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 66, n. 1, 2014.
- BUERY *et al.* Prevalence of toxoplasmosis in a rural área of Santa Teresa, Espírito Santo. In: II Simpósio de Brasileiro de Toxoplasmose, 2013, São Paulo, **Anais...**São Paulo: 2013. p. 12-13.
- CARRUTHERS, Vern B.; SUZUKI, Yasuhiro. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. **Schizophrenia Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 745-751, 2007.
- CAMARGO, M.E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.6, p.117-118, 1964.
- CANTOS, G. A. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, n.4, p. 335-341, 2000.

- CHIARI, C. A.; NEVES, D. P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 3, p. 337-340, 1984.
- CHOI, W. Y. *et al.* Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 175, n. 5, p. 1280-1282, 1997.
- COOK, A. J. C. *et al.* Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control studyCommentary: Congenital toxoplasmosis—further thought for food. **Bmj**, v. 321, n. 7254, p. 142-147, 2000.
- DAGUER, H. *et al.* Soroprevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em bovinos e funcionários de matadouros da microrregião de Pato Branco, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1133-1137, 2004.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of Animals and Man**. CRC Press, Inc., 1988.
- DUBEY, J. P. Toxoplasmosis—a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, n. 1, p. 57-72, 2004.
- DIAS, R. A. F.; FREIRE, R. L. Surtos de toxoplasmose em seres humanos e animais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 2, p. 239-248, 2005.
- ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A. *Toxoplasma gondii* infection in sheep and cattle. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 191-196, 1997.
- FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.126, p.664-673, 1972.
- FRENKEL J.K. Toxoplasmose. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. v. 2, p. 1310-1325.
- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T. Levantamento soropidemiológico da toxoplasmose em moradores da zona rural do município de Guaraci - Paraná - Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.16, p.63-67, 1995.
- GARCIA, J. L. *et al.* Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 01, p. 91-97, 1999.
- HIRAMOTO, R. M. *et al.* Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. **Revista de Saúde Pública**, v.35, n.2, 2001.
- HEUKELBACH, J. *et al.* Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 2, p. 287, 2007.

ISAAC-RENTON, J. *et al.* Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2278–2280, 1998.

JONES, J. L. *et al.* Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 582-587, 2006.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 423-432, 2004.

LAFFERTY, K. D. Can the common brain parasite *Toxoplasma gondii*, influence human culture? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1602, p. 2749-2755, 2006.

LIMA, V. Y. **Inquérito soro-epidemiológico em acadêmicos de medicina veterinária de duas universidades do oeste do Paraná para a ocorrência de toxoplasmose e leptospirose**. Botucatu, 73p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, 2008.

LIN, Y. L. *et al.* Seroprevalence and sources of *Toxoplasma* infection among indigenous and immigrant pregnant women in Taiwan. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 67-74, 2008.

NAVARRO, I.T. *et al.* Estudo da resistência do *Toxoplasma gondii* ao efeito do cloreto de sódio e condimentos em linguiça frescal de suínos. **Boletim Sanitário Panamericano**, v. 112, p.138-143, 1992.

OLIVEIRA, A.A.; BEVILACQUA, P.D.; PINTO, P.S.A. Principais protozoários transmissíveis por produtos de origem animal. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n.43, p.5-14, 2004.

REMYINGTON, J.S.; MCLEOD, R.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In JS Remington e JO Klein (eds), **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant**, 4th ed., WB Saunders, Philadelphia, p. 140-267, 1995.

REZENDE-FIGUEIREDO, H. *et al.* Seroepidemiological survey of toxoplasmosis and evaluation of the conditioning factors for its transmission in undergraduate students from Campo Grande Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Scietia Medica**, v. 20, n. 1, p.71-75, 2010.

SILVA, A.V. *et al.* Genotyping of *Toxoplasma gondii* strains detected in pork sausage. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 60, p. 65-68, 2005

SOUZA, W.J.S. **Epidemiologia da toxoplasmose: avaliação sorológica de suínos e trabalhadores em abatedouros na mesorregião do Grande Rio de Janeiro**. 1995. 102f. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SOUZA, W.J.S. *et al.* Epidemiological aspects of toxoplasmosis in Schoolchildren residing in localities with urban or rural characteristics within the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 475-482, 1987.

SPALDING, S.M. *et al.* Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, n.2, p.173-177, 2005.

SROKA, J.; WÓJCIK-FATLA, A.; DUTKIEWICZ, J. Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. **Annals of Agricultural Environmental Medicine**, v. 13, p. 169–175, 2006.

TENTER, A.M. Current knowledge on the epidemiology of infections with *Toxoplasma*. **The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 23, n. 6, p. 391, 1999.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1217-1258, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	93
ANEXO 2 – Parecer Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-SCA)	94
ANEXO 3 –Auxílio financeiro recebido - CNPq edital universal 14/2011.....	95
ANEXO 4 – Preparo das lâminas de reação Imunofluorescência Indireta (RIFI), com taquizoítas de <i>N. caninum</i> ou <i>T. gondii</i> obtidos de cultivo celular.....	96
ANEXO 5 – Reação da Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos anti- <i>Neospora caninum</i> ou <i>Toxoplasma gondii</i>	97
ANEXO 6 - Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	98
ANEXO 7 - Eletroforese em gel de agarose 1,4%.....	100
ANEXO 8 – Inquérito epidemiológico.....	101

ANEXO 1 – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

<p>Parecer Nº 0005017/11 Título do projeto PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À NEOSPOROSE E TOXOPLASMOSE EM POPULAÇÃO HUMANA E ANIMAL SUSCETÍVEIS Protocolo CONEP 0374.0.000.084-11 Instituição PUCPR Campus Toledo</p>	<p>Protocolo CEP Nº 5998 Grupo Versão 2 Pesquisador responsável ANDRÉA CHRISTINA FERREIRA MEIRELLES</p>
---	--

Situação Aprovado

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

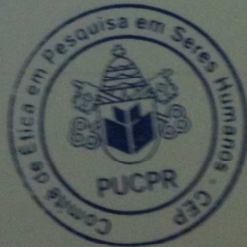
Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 25 de Maio de 2011.


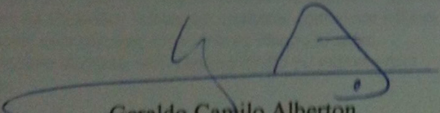
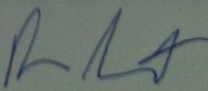
Prof. MSc. Naim Akel Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
PUC PR

(Assinatura)

Sergio Siqueira de Siqueira
Professor Doutor
Pontifícia Universidade Católica
do Paraná - PUCPR



ANEXO 2 – Parecer Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-SCA)

 UFPR	Universidade Federal do Paraná Setor de Ciências Agrárias Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA
 CERTIFICADO 	
<p>Certificamos que o protocolo no. 054/2010, referente ao projeto “Prevalência e fatores de risco associados a neosporose e toxoplasmose em população humana e animal suscetíveis”, sob a responsabilidade de Andréa C. F Meirelles, na forma que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 09 de Dezembro de 2010. Este certificado expira em 09 de dezembro de 2011.</p>	
 CERTIFICATE 	
<p>We certify that the protocol number 054/2010, regarding the project “Prevalence and risk factors associated with toxoplasmosis and neosporosis in human population and feed susceptible”, in charge of Andréa C. F Meirelles, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on December 2010. This certificate expires on December, 2011.</p>	
<p>Curitiba, 09 de dezembro de 2010.</p>	
 Geraldo Camilo Alberton Presidente	 Patrick Schmidt Vice-Presidente
<p>Comissão de Ética no Uso de Animais Setor de Ciências Agrárias Universidade Federal do Paraná.</p>	

ANEXO 3 –Auxílio financeiro recebido - CNPq edital universal 14/2011.



Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO E PAÍS SEM POBREZA

Divulgação de resultados de concessão de auxílio

Concedente: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Objetivo: Concessão de auxílio financeiro à pesquisa liberado para a:

- Chamada Pública Universal 14/2011 - Faixa A - até R\$20.000,00

Vigência: A partir da data de aceitação pelos beneficiários e pelo período de duração aprovada conforme detalhamento da planilha abaixo.

Nº Processo	Modalidade	Duração	Beneficiário	Custeio (R\$)	Capital (R\$)
480829/2011-0	APQ	24 meses	Rosangela Locatelli Dittrich	R\$ 3.100,00	R\$ 16.850,00

ANEXO 4 – Preparo das lâminas de reação Imunofluorescência Indireta (RIFI), com taquizoítas de *N. caninum* ou *T. gondii* obtidos de cultivo celular

Material:

1. Retirar o meio de cultivo das garrafas infectadas com os taquizoítas. Lavar a monocamada com PBS.
2. Remover a monocamada de células com uma haste de borracha, ou com 1,0 ml de tripsina. Os taquizoítas podem ser retirados com menor número de células, sem a remoção completa do tapete celular.
3. Transferir a suspensão para um tubo de Falcon. Passar a suspensão em agulha (25X6) e seringa, três vezes, para romper as células. A filtração com filtro de 5 µm pode ser utilizada para remover os restos celulares.
4. Centrifugar a suspensão por 10 minutos, a 1.000 rpm, na temperatura de 6°C;
5. Remover o sobrenadante e ressuspender o sedimento com 1,0 ml de PBS;
6. Contar os protozoários na câmara de Neubauer;
7. Número de taquizoítas/mL = (número médio de taquizoítas/quadrado grande da câmara) x (10^4) x (fator de diluição);
8. Centrifugar por 10 minutos, a 1.000 rpm, na temperatura de 6°C; descartar o sobrenadante. Repetir a lavagem com PBS e centrifugar novamente;
9. Diluir o inóculo com PBS pH 7,2 para uma quantidade de $1,0 \times 10^6$ taquizoítas / mL.
10. Limpar as lâminas previamente com álcool etílico 70%;
11. Depositar 30 µl (30.000 taquizoítas / orifício) da suspensão em cada orifício da lâmina de IFI;
12. Secar as lâminas na estufa a 37°C, ou em temperatura ambiente.
13. Manter as lâminas a – 20°C. O prazo de utilização das lâminas é de 6 meses.

ANEXO 5 – Reação da Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* ou *Toxoplasma gondii*

Material: lâminas para imunofluorescência com 10 orifícios cada, sensibilizadas com taquizoítas de *N. caninum* ou *T. gondii*. Conservação: – 20°C. Em cada lâmina, além dos soros testes, foram incluídos os soros controles positivo e negativo.

Técnica:

1. Identificar as lâminas na parte polida e anotar as amostras em protocolo controle;
2. Diluir as amostras de soro com PBS pH 7,2;
3. Retirar as lâminas do congelador;
4. Secar sob ventilação, por 10 minutos;
5. Colocar as lâminas em banho de acetona, por 10 minutos, no congelador;
6. Secar;
7. Colocar 25 µl de cada amostra de soro diluído nos orifícios (poço) da lâmina;
8. Incubar as lâminas por 30 minutos, a 37°C, em câmara úmida;
9. Lavar com PBS, por 10 minutos, nas cubas;
10. Lavar com água destilada;
11. Secar;
12. Colocar o conjugado específico (25 µl/poço);
13. Incubar as lâminas por 30 minutos, a 37°C, em câmara úmida;
14. Lavar com PBS, por 10 minutos, nas cubas;
15. Lavar com água destilada, por 5 minutos;
16. Secar;
17. Colocar a glicerina 90% (tamponada com PBS), entre as duas fileiras de orifícios e colocar uma lamínula;
18. Examinar as lâminas no microscópio de imunofluorescência.

ANEXO 6 - Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Na PCR foi preparado um *mix* de acordo com a TABELA 1 abaixo. O volume da reação foi de 25µl.

TABELA 1 - Componentes da reação da polimerase em cadeia para amplificação do DNA de *Neospora caninum* ou *Toxoplasma gondii* e respectivas concentrações na reação com os *primers* Np6/Np21 ou TOX4/TOX5.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE USO	VOLUME NA REAÇÃO (µL)	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água Mili-Q	----	18,4	qsp
Tampão	10X	2,5	1X
Primer	25 mM	0,5	0,5 pmol
Primer	25 mM	0,5	0,5 pmol
MgCl ₂	50 mM	0,75	1,5 mM
DNTPs	25 mM	0,2	0,2 mM
Taq polimerase	50 mM	0,2	1 U/µl
DNA	----	1,5	60 ng
Total	----	25,0	----

TÉCNICA DA PCR:

1. Preparar o *mix* em fluxo laminar de acordo com o número de amostras de DNA, considerando o tubo branco;
2. Adicionar os componentes da reação em tubo de eppendorf® na sequência apresentada até a Taq polimerase. Manter os reagentes do mix no gelo e adicionar por último a enzima Taq polimerase. Preparar um tubo branco;
3. Homogeneizar o mix no tubo de eppendorf® em vortex (30 segundos);
4. Distribuir as alíquotas determinadas do mix nos tubos de eppendorf® para PCR;
5. Acrescentar as amostras de DNA;
6. Homogeneizar cada tubo em vortex (2 segundos) após colocar a amostra;
7. Incubar as amostras no termociclador;

A amplificação no termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler® foi realizada com os seguintes programas:

<i>N. caninum</i> primer NP6 e NP21			<i>T. gondii</i> primer TOX4 e TOX5		
94°C	5 minutos	1 ciclo	94°C	5 minutos	1 ciclo
94°C	35 segundos	} 32 ciclos	94°C	35 segundos	} 32 ciclos
54°C	30 segundos		65°C	30 segundos	
72°C	30 segundos		72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	1 ciclo	72°C	5 minutos	1 ciclo
4°C	∞		4°C	∞	

Após a amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese (Protocolo Anexo 7).

ANEXO 7 - Eletroforese em gel de agarose 1,4%

1. Preparar o gel de agarose (UltraPure™ Agarose - Invitrogen®) a 1,4% em tampão TAE 1X;
2. Colocar a agarose na cuba com o pente. Após solidificar retirar o pente com cuidado;
3. Acrescentar o tampão TAE 1X (700ml) na cuba com o gel solidificado;
4. Distribuir alíquotas de 1,5µl do corante Safer Dye Kasvi® sobre um parafilme em numero igual ao das amostras;
5. Misturar 5µl de cada amostra ao Safer Dye Kasvi® e depositar nos poços do gel, iniciando com o marcador de pares de bases (1Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen 250ug (1,0ug/ul);
6. Conectar os cabos da fonte de eletroforese na cuba DIGEL® JY-SPCT, proceder a eletroforese a 95V utilizando a fonte Thermo Scientific® EC300XL, migrando do polo negativo (preto) para o positivo (vermelho);
7. Desligar após migração de 2/3 da cuba;
8. Retirar o gel da cuba e fazer leitura em transiluminador de ultravioleta (Loccus biotecnologia® LTB-20x20ST) e fotografar.

*Tampão TAE – Tris acetato na solução concentrada 50X:

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 ml
q.s.q	1.000 ml

Manter na geladeira e no momento do uso diluir para 1X com água destilada. A solução de uso apresenta as concentrações 0,04 M de Tris acetato e 0,001 M de EDTA.

ANEXO 8 – Inquérito epidemiológico

Protocolo nº _____

Escolaridade:

Possui doenças de base:

Realiza exames de rotina:

data do ultimo exame:

resultados:

Numero de gestações:

Gestações a termo:

aborto:

nascidos vivos:

parto prematuro:

Intercorrências na gestação:

Já realizou transfusão de sangue:

Transplante de órgãos:

Faz uso contínuo de medicamentos:

Faz uso de medicamentos controlados:

No último ano teve:

Febre:

dor de cabeça:

confusão:

náusea:

coordenação ruim:

Têm ou teve:

Doenças oculares:

Lesões consequentes de infecção nos olhos:

Possui fossa séptica:

Tratamento de esgoto:

Esgoto a céu aberto:

Presença de cães e/ou gatos?

Quais os cuidados de higiene praticados com alimentos:

Tem atividades relacionadas á manipulação de terra, areia?

Qual (is): _____

Tem hábito de comer carne crua ou mal passada? () Sim; () Não.

Sim, de que espécie? _____

Tem hábito de comer embutidos artesanais?

Como prepara as verduras, legumes e frutas para comer?

Tem o hábito de ingerir leite cru? () Não; () Às vezes; () Sempre.

Sim, de que espécie? _____

Leite fervido? () Não; () Às vezes; () Sempre.

Leite pasteurizado? () Não; () Às vezes; () Sempre.

Queijo fresco (queijo minas)? () Não; () Às vezes; () Sempre.

Qual a origem da água de bebida da residência? () Torneira; () Mineral;

() Poço; () Filtrada; () Outro _____.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Verificou-se possível associação entre a infecção por HIV e a ocorrência de anticorpos contra *N. caninum*. É necessária a continuidade nas pesquisas em relação ao papel da infecção por *N. caninum* em outros grupos de indivíduos imunocomprometidos tais como: pacientes imunodeprimidos transplantados, oncológicos e em processo de hemodiálise.

Neste contexto, os procedimentos adotados em relação ao contato de pacientes imunodeprimidos e felídeos, no caso da prevenção da toxoplasmose, poderiam ser adotadas medidas semelhantes no que se refere ao contato de cães e estes grupos de pacientes, quando se pretende prevenir a infecção por *N. caninum*, particularmente quando estes animais estão em contato com pacientes HIV positivos.

VITA

Andréa Christina Ferreira Meirelles nascida em Londrina, Paraná, em 31 de julho de 1975, possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Londrina (2001), Residência em Clínica Médica e Cirúrgica de Animais de Companhia pela PUCPR (2004) e Mestrado em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Paraná (2006). Atualmente é Professora Adjunta I das disciplinas de Clínica Médica de Animais de Companhia e Laboratório Clínico Veterinário na PUCPR *Campus* Toledo. Docente responsável pelo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da PUCPR *Campus* Toledo. Participa como revisora científica dos periódicos: *Ciência Rural*, *Bioscience Journal* e *Archives of Veterinary Science*.